

# **Calcitonin in Diagnostik und Therapie des hereditären medullären Schilddrüsenkarzinoms bei Kindern und Jugendlichen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von:

Felix Eckelt

geboren am 21.07.1989 in Greifswald

angefertigt an:

Universität Leipzig, Medizinische Fakultät,

Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik

Betreuer:

Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Kratzsch

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 14.07.2020

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>III</b>
<b>2. Bibliographische Beschreibung.....</b>	<b>IV</b>
<b>3. Einführung .....</b>	<b>1</b>
3.1 Calcitoninwirkung und Calciumhomöostase.....	1
3.2 Spontanes versus hereditär auftretendes medulläres Schilddrüsenkarzinom.....	2
3.3 Diagnostik des medullären Schilddrüsenkarzinoms bei Kindern und Jugendlichen .....	3
3.3.1 <i>RET</i> -Protoonkogen .....	4
3.3.2 Calcitonin .....	5
3.3.3 Carcinoembryonales Antigen, Procalcitonin und Chromogranin A .....	10
3.4 Etablierung von Referenzwerten für Calcitonin bei Kindern und Jugendlichen	11
3.5 Aufgabenstellungen .....	12
<b>4. Publikationsmanuskript .....</b>	<b>13</b>
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>25</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>7. Addendum .....</b>	<b>XVII</b>
7.1 Darstellung des eigenen Beitrages.....	XVII
7.2 Selbstständigkeitserklärung .....	XIX
7.3 Curriculum vitae .....	XX
7.4 Publikationen .....	XXI
7.5 Danksagungen .....	XXII

## 1. Abkürzungsverzeichnis

ATA	-	American Thyroid Association
CEA	-	Carcinoembryonales Antigen
CgA	-	Chromogranin A
CT	-	Calcitonin
ECLIA	-	Elektrochemischer Lumineszenzimmunoassay
FMTc	-	Familiäres medulläres Schilddrüsenkarzinom
LIFE	-	Leipziger Forschungszentrum für Zivilisationserkrankungen
MEN 2	-	Multiple Endokrine Neoplasie Typ 2
MTC	-	Medulläres Schilddrüsenkarzinom
PCT	-	Procalcitonin
RANK	-	Rezeptoraktivator des NF- $\kappa$ B
RET	-	<i>RET</i> -Protoonkogen
u.a.	-	unter anderem
z.B.	-	zum Beispiel

## 2. Bibliographische Beschreibung

Eckelt, Felix

Dissertationstitel: Calcitonin in Diagnostik und Therapie des hereditären medullären Schilddrüsenkarzinoms bei Kindern und Jugendlichen

Universität Leipzig, Medizinische Fakultät, Dissertationsschrift

51 Seiten, 1 Abbildung, 127 Literaturangaben, 1 Originalpublikation, 1 Supplemental Data

### Inhalt

Calcitonin (CT) wird hauptsächlich in den C-Zellen der Glandula Thyroidea sezerniert und ist der sensitivste Tumormarker zur frühzeitigen Diagnose und Therapiekontrolle des medullären Schilddrüsenkarzinoms (MTC). Zwischen dem 50. - 60. Lebensjahr ist die Prävalenz des vergleichbar seltenen, aber bei verspäteter Diagnose oft tödlich verlaufenden, Karzinoms am höchsten. Im Erwachsenenalter tritt die Neoplasie zu  $\frac{3}{4}$  spontan und zu  $\frac{1}{4}$  hereditär, z.T. im Rahmen des Syndroms der multiplen endokrinen Neoplasie Typ 2 A (MEN 2A), B (MEN 2B) und familiären medullären Schilddrüsenkarzinoms (FMTC) auf. Zur Diagnostik des MTC müssen erhöhte CT-Werte potentieller Patienten von denen gesunder Probanden abgegrenzt werden. Dafür werden von Diagnostika-Herstellern CT-Referenzbereiche im Methodenbeipackzettel angegeben, die bei den Erwachsenen ermittelt wurden. Validierte pädiatrische Referenzwerte für CT sind derzeit kaum verfügbar. Im Vergleich zu den Erwachsenen tritt das MTC bei Kindern und Jugendlichen fast ausschließlich hereditär auf und birgt die Gefahr unterdiagnostiziert zu werden. Abhängig von der Mutation im *RET*-Protoonkogen (*RET*) kann eine Thyreoidektomie bereits im 1. Lebensmonat notwendig sein, um eine C-Zellen-Hyperplasie oder ein bereits nachweisbares MTC zu entfernen. Die aussichtsreichste Therapieoption ist die frühzeitige Operation mit einer 10-Jahresüberlebensrate von 98 - 100%. Sind jedoch in mehr als 10 Lymphknoten Metastasen zu finden, ist nur in 0 - 4% eine kurative Behandlung möglich. Um die gute Prognose des MTC durch eine frühzeitige Diagnostik und die damit verbundene notwendige Thyreoidektomie

wahren zu können, ist das Ziel dieser Arbeit die Erstellung von CT-Referenzwerten im Serum bei Kindern und Jugendlichen. Darüber hinaus sollten die altersabhängigen Referenzwerte genutzt werden, um die erfolgreiche Behandlung longitudinal zu überwachen und ein Rezidiv frühzeitig zu erkennen.

Zur Realisierung der Arbeit konnten wir auf Daten der LIFE-Child-Kohorte und damit auf das bisher größte Probenkollektiv ( $n = 6090$ ), aus dem CT-Referenzwerte ermittelt wurden, zurückgreifen. Die Besonderheit an der Kohorte ist, dass sie sich ausschließlich aus klinisch gesunden Probanden zusammensetzt und CT beeinflussende Medikation und Diagnosen ausgeschlossen wurden. Hinzu kommt die Lagerung der Proben in der LIFE Biobank, was die Einhaltung der notwendigen Präanalytik einer der empfindlichsten Parameter in der täglichen Laborroutine und deren Standardisierung ermöglichte. Analytisch nutzten wir den bisher sensitivsten Immunoassay zur Bestimmung des Hormons, den elektrochemischen Lumineszenzimmunoassay. Mithilfe der LMS-Methode wurde die Erstellung von Referenzwerten für das CT durchgeführt und die Ergebnisse wurden in einer klinischen Kohorte von MEN 2 und Schilddrüsen erkrankten Kinder und Jugendlichen validiert. Dies ist bisher die einzige Studie, die nicht nur eine Altersabhängigkeit, sondern auch eine Geschlechtsabhängigkeit mit höheren CT-Werten bei Jungen nachweisen konnte. Wir konnten weiterhin bestätigen, dass die höchsten CT-Werte im Serum bei Säuglingen zu finden sind und dass diese im weiteren Altersverlauf sinken. Bisher unbekannt war, dass der CT-Spiegel während der Pubertät erneut bei beiden Geschlechtern abnimmt. In der Validationskohorte von Kindern mit MEN 2 wurde bei 71% eine biochemische Heilung verzeichnet, während bei 5 Patienten Mikrometastasen oder ein unvollständige Schilddrüsenentfernung diagnostiziert werden konnten. In der zweiten Validationskohorte, die pädiatrische Patienten mit Schilddrüsenerkrankungen umfasst, konnten wir keine Korrelation mit der Höhe des CT-Wertes nachweisen.

Ziel der Arbeit war es alters- und geschlechtsabhängige Referenzwerte für pädiatrische Patienten zu ermitteln, um ein präzises Labormonitoring bei Kindern und Jugendlichen mit einer MEN 2 Erkrankung zu ermöglichen. Die Nutzung von adulten CT-Referenzwerten für pädiatrische Proben soll somit überflüssig werden. Damit steht dem Kinderarzt<sup>1</sup> ein valides diagnostisches Werkzeug zur Verfügung, um die gute Prognose des MTC durch eine frühzeitige Diagnose und Therapie zu wahren.

---

<sup>1</sup> Finden in der Dissertation maskuline Personenbezeichnungen Verwendung, beziehen sich diese stets auf männliche und weibliche Personen.

### **3. Einführung**

#### **3.1 Calcitoninwirkung und Calciumhomöostase**

Im Jahr 1961 beobachteten Copp et al. (1) unter forcierter Calciumsubstitution einen raschen Abfall des Blutcalciumspiegels und benannten die humorale Substanz nach ihrer Funktion, den Tonus des Calciums zu nivellieren – Calcitonin (CT). Das Polypeptid CT besteht aus 32 Aminosäuren und wird hauptsächlich durch die parafollikulären C-Zellen der Schilddrüse sezerniert. C-Zellen sind ubiquitär im Menschen vorhanden und somit auch im Thymus, Hepar, Pulmo, Duodenum oder Jejunum nachweisbar (2). Somit lassen sich auch im Gastrointestinaltrakt, in der Niere und im Knochen die Effekte von CT beobachten. Die Exozytose von CT ist bei hohen Calciumkonzentrationen im Serum physiologisch. In den Nieren wird die renale Elimination von Calcium, Phosphat, Magnesium, Natrium und Kalium erhöht (3). Über die Wirkung auf den Knochenstoffwechsel wird ebenfalls die Calcium- und Phosphatkonzentration im Blutserum reduziert, indem der Rezeptoraktivator NF- $\kappa$ B (RANK) induziert wird. Hierdurch retrahieren sich die Pseudopodien der Osteoklasten, sodass die Knochenresorption verringert (4, 5, 6), der anabole Effekt auf den Knochenstoffwechsel erhöht (7, 8, 9) und der trabekuläre Knochen mineralisiert wird (10), u.a. durch erhöhte Osteoprotegerinexpression (11).

Die Synthese von CT wird in engen Grenzen reguliert und korreliert linear zur Calciumkonzentration im Serum (12). Dennoch nimmt CT in der Calcium- und Phosphathomöostase hinter dem Parathormon und Calcitriol eine untergeordnete Bedeutung ein. So bleibt nach vollständiger Thyreoidektomie die erwartete Osteoporose aus und die Calciumhomöostase bleibt unbeeinträchtigt (13). Phylogenetisch gehört CT zu einem der ältesten Hormone (14). So konnten sich in Wirbeltieren verschiedene Isoformen mit unterschiedlicher Wirkung auf den CT-Rezeptor entwickeln (15, 16). Die höchste Bioaktivität besitzt das CT vom Lachs (5, 17), das klinische Bedeutsamkeit in der Behandlung der Osteodystrophia deformans und Hyperkalziämie erhielt. Seit dem Juli 2012 ist CT von der „European Medicines Agency“ nicht mehr für die Therapie der Osteoporose zugelassen, da es in oraler (0,7%) und nasaler (2,4%) Applikation die Tumorgenese unterstützt und nur einen limitierten Einfluss auf postmenopausale Wirbelsäulenfrakturen hat (18). In der Klinik ist CT jedoch vor allem bekannt für seine Funktion als Tumormarker zum Nachweis des malignen medullären Schilddrüsenkarzinoms (MTC), sowie der benignen C-Zellhyperplasie (19).

### 3.2 Spontanes versus hereditär auftretendes medulläres Schilddrüsenkarzinom

Für ca. 3% aller neudiagnostizierten Neoplasien ist das Schilddrüsenkarzinom verantwortlich und ist somit der häufigste endokrine Tumor (20). Unterschieden werden die folgenden vier Tumorentitäten: Papilläres, follikuläres, anaplastisches und medulläres Schilddrüsenkarzinom, wobei zuletzt genanntes im Fokus der Arbeit stehen soll.

Das MTC ist mit 5 - 10% ein vergleichsweise seltenes Malignom der Glandula Thyroidea und betrifft die parafollikulären Zellen, auch C-Zellen genannt (21). Die höchste Prävalenz ist zwischen dem 50. - 60. Lebensjahr zu finden (22). Zudem ist die spontane Ausprägung tendenziell eher bei Frauen als bei Männern (1,3:1) vorhanden, während bei der vererbten Erkrankung keine Geschlechtsabhängigkeit nachweisbar ist (23). Bei Erwachsenen tritt das MTC zu 75% sporadisch auf, wobei 25% der Erkrankungen dem Syndrom der multiplen endokrinen Neoplasie Typ 2 (MEN 2A und MEN 2B) zugehörig sind, welches autosomal-dominant vererbt wird (24). Die sporadische und die hereditäre Form verlaufen klassischerweise progredient und beginnen mit einer C-Zellhyperplasie, setzen sich über das lokale MTC bis hin zum Befall regionaler Lymphknoten fort und enden schließlich mit distaler Metastasierung.

Beim MEN 2 wird entsprechend der unterschiedlichen *RET*-Protoonkogen-Mutationen (*RET*) mit Ausprägung verschiedener Begleiterkrankungen in MEN 2A (Sipple-Syndrom) und MEN 2B (Gorlin-Vickers-Syndrom) unterschieden. Gemein ist beiden Ausprägungen das MTC als Leiterkrankung. Am häufigsten vorkommend ist das MEN 2A mit 23%, welches je nach Begleitdiagnosen weiter unterschieden werden kann in

1. MTC mit einem Phäochromozytom,
2. MTC mit äußerst seltenem Auftreten eines Phäochromozytoms, familiäres MTC (FMTC),
3. MTC mit primärem Hyperparathyreoidismus,
4. MTC mit Phäochromozytom und primärem Hyperparathyreoidismus,
5. MTC mit Morbus Hirschsprung und
6. MTC mit Lichen amyloidosis (24, 25, 26).

Das aggressivere Syndrom MEN 2B ist mit 2% seltener als das MEN 2A und kann sich aus den Einzeldiagnosen MTC, Phäochromozytom, Ganglioneurom und marfanoidem Habitus zusammensetzen (22).

Typischerweise stellt sich der Patient<sup>2</sup> beim Erstkontakt mit einer indolenten Schilddrüsenanschwellung vor, die Beschwerden wie Dysphagie, Dyspnoe und Dysphasie verursacht (22). Das fortgeschrittene MTC ist durch Schilddrüsenanschwellung, Diarrhoe, Flush oder auch Knochenschmerzen gekennzeichnet (22, 26, 27). Zu beachten sind Symptome eventueller Begleitdiagnosen, die auf ein MEN 2 hinweisend sein könnten wie z.B. bei Phäochromozytom persistierender Hypertonus, Tachykardie, Palpitation, Kopfschmerz, Unruhe; bei primärem Hyperparathyreoidismus Nephrolithiasis, Knochen- und Gelenkschmerzen, Appetitlosigkeit, Übelkeit, Ulcus ventriculi und Ulcus duodeni; bei Morbus Hirschsprung Obstipation; bei Lichen amyloidosus weißliche Papeln auf dem Rücken oder bei Ganglioneuromen Papeln an Lippe oder Zunge (22, 27).

Bedingt durch die *RET*-Mutation entwickelt sich auf Basis der benignen C-Zellhyperplasie ein malignes MTC. Die Tumorentität ist dadurch gekennzeichnet, dass sie frühzeitig in die mediastinalen und zentralen, sowie laterozervikalen Lymphknoten metastasiert, oft bevor der Primärtumor identifiziert wurde (22). So weisen bei Erstvorstellung bereits  $\frac{2}{3}$  der Patienten Lymphknotenmetastasen (28) und 5% distale Metastasen (29) in Lunge, Leber, Knochen, Gehirn und Haut (30) auf. Die Prognose des zumeist langsam wachsenden Tumors ist im Stadium 1 (T1 N0 M0) mit einer 10-Jahresüberlebensrate von 98 - 100% sehr gut. Die 10-Jahresüberlebensrate zeigt sich jedoch im Stadium IV (T4a N0 M0, T1 N1b M0, Tx Nx M1 oder ähnlich) (31) mit 21 - 46% vergleichsweise stark vermindert (23). Somit ist der wichtigste prognostische Faktor beim MTC der Zeitpunkt der Diagnosestellung (32, 33, 34).

### **3.3 Diagnostik des medullären Schilddrüsenkarzinoms bei Kindern und Jugendlichen**

In der Pädiatrie stellen die autosomal-dominant vererbten Formen des MTC eine besondere Herausforderung an den behandelnden Arzt dar, da sie, anders als in der Onkologie des Erwachsenen, den weitaus größeren Teil der Erkrankungen ausmachen (35). Um die gute Prognose des MTC zu wahren, ist eine rechtzeitige Diagnose wesentlich für das Überleben des Kindes (22). Einen integralen Bestandteil im Krankheitsmanagement des MTC stellt die Labordiagnostik dar. Sie umfasst die genetische Mutationstestung des *RET* und die Bestimmung des CT. Die Erweiterung der Parameter um Carcinoembryonales Antigen (CEA), Procalcitonin (PCT) und Chromogranin A (CgA) ist möglich.

---

<sup>2</sup> Finden in der Dissertation maskuline Personenbezeichnungen Verwendung, beziehen sich diese stets auf männliche und weibliche Personen.



### 3.3.1 *RET*-Protoonkogen

Das *RET* kodiert für einen Tyrosinkinaserzeptor, dessen Stimulation Zellwachstum und -differenzierung vor allem in neuroendokrinen Geweben fördert (36), zu denen u.a. die C-Zellen der Schilddrüse gezählt werden. 1985 wurde das Protoonkogen *RET* erstmalig beschrieben (37), dessen Vielzahl an bekannten Duplikations-, Insertions-, Deletions- und Missensemutationen zur Entstehung des MEN 2 führen (38, 39). Die *RET*-Mutationen lassen sich zum Teil den verschiedenen MEN 2 Erkrankungen und Symptomen zuordnen. Bei 85% der Patienten mit MEN 2A können Mutationen im Kodon 634 zu finden sein und in weiteren 10 - 15% sind hauptsächlich Kodon 609, 611, 618 und 620 betroffen. Bei Patienten mit dem Syndrom MEN 2B lässt sich die *RET*-Mutation zu 95% in Kodon 918 (40) aber auch in Kodon 883 (25) nachweisen, während sich *RET*-Mutationen bei Patienten mit FMTC in Kodon 768, 790, 791, 804, 844, 618 oder 620 deutlich heterogener zeigen und zum Teil mit denen des MEN 2A überlappend sind (22, 40). Aufgrund der engen genetischen und klinischen Beziehungen wird aktuell nicht mehr empfohlen, das FMTC vom MEN 2A zu trennen, sondern es stattdessen als Variante des MEN 2A zu zählen, bei der die betroffenen Familien unter einem MTC mit geringer Wahrscheinlichkeit einer Entwicklung einer Nebenerkrankung leiden (25).

Die Bestimmung der *RET*-Mutation wird bei Patienten mit klinischem Verdacht auf ein MEN laut American Thyroid Association (ATA) empfohlen (26). Nicht zuletzt, weil anhand der Mutationen auch Rückschlüsse auf das Vorkommen eines Phäochromozytom (Kodon: 609, 611, 618, 620, 634, 791, 804, 918) und Hyperparathyreoidismus (Kodon: 634) (40) gezogen werden können, sondern auch, da das Auftreten eines hereditär erworbenen MTC mit einer spezifischen *RET*-Mutation einhergeht (33, 41). Aufgrund der prädiktiven Aussagekraft der *RET*-Mutation sollte die Sequenzierung der Leukozyten-DNA (42) so früh wie möglich erfolgen, um das Risiko zur Entwicklung eines MTC stratifizieren zu können (35). Weiterhin konnte bei 7,3% der sporadischen MTC Erkrankungen eine *RET*-Mutation detektiert werden (43).

Die aktualisierten Richtlinien der ATA teilen die Beziehungen zwischen *RET*-Mutation und Risiko der Entstehung eines MTCs in den drei Kategorien ein: „highest risk“, „high risk“ and „moderate risk“: ATA-HST (z.B.: *RET* 918), ATA-H (z.B.: *RET* 634, 883) und ATA-MOD (z.B.: *RET* 611 und weitere) (26). Entsprechend der Mutation, der ATA-Empfehlungen und Datenbanken (39), lässt sich ein ungefähres Alter für das Auftreten eines MTC vorhersagen (35). Die aggressivste Form des MTC, das MEN 2B (*RET*: 918), tritt im Alter von 0,17 Jahren

auf und wird als ATA-HST kategorisiert, da es mit einer fast vollständigen Penetranz der Mutation einhergeht (26). Die ATA empfiehlt eine vollständige Thyreoidektomie innerhalb des ersten Lebensjahres. *RET* 883 und 634 werden in den Leitlinien als ATA-H zusammengefasst und betroffene Kinder können im Alter von 0,8 - 10 Jahren ein MTC ausbilden. Eine Schilddrüsenentfernung wird bis zum 5. Lebensjahr empfohlen und richtet sich nach der CT-Konzentration im Serum. Kinder mit weiteren *RET*-Mutationen werden in der Gruppe ATA-MOD zusammengefasst und sollten einer Therapie unterzogen werden, sobald das Serum CT erhöht ist. Mit der Kontrolle des CT sollte ab dem 5. Lebensjahr begonnen werden; der Wert im 6. Jahr halbjährlich und danach jährlich kontrolliert werden. Entsprechend einer Vielzahl von *RET*-Mutationen, die in dieser Kategorie zusammengefasst werden, ist das ungefähre Alter des Auftretens eines MTC zwischen 4 - 61 Jahren entsprechend heterogen (26, 35). Eine genetische Testung sollte in der Kategorie ATA-HST nach Geburt, ATA-H vor dem 3. Lebensjahr und ATA-MOD bis zum 5. Lebensjahr erfolgen (44). Aufgrund der genetischen Testung konnte die Inzidenz des MTC in betroffenen Familien reduziert werden (45, 46). Nichtsdestotrotz sollten neben *RET*-Mutationen auch andere Signalwege bei der Entstehung eines MTC, wie die Inaktivierung des Rb1-Tumorsuppressorgens (47), dysregulierte Mikro-RNAs (48, 49) oder RAS-Mutationen (50) berücksichtigt werden, da die Tumorgenese auch in Abwesenheit von *RET*-Mutationen entstehen kann (44).

### **3.3.2 Calcitonin**

Das MTC ist durch eine rasche Metastasierung gekennzeichnet, die mit einer Prognoseverschlechterung einhergeht, wobei die Metastasierungsrate 50 - 70% bei einer Tumorgöße von <1cm - 4cm in das zentrale und ipsilaterale Lymphknotenkompartiment beträgt (51). Es ist somit wahrscheinlich, dass Patienten mit MTC bereits Symptome einer Fernmetastasierung bei Erstvorstellung zeigen (52, 53). Die Sensitivität des intraoperativen Assessments zur Beurteilung einer nodalen Metastasierung liegt lediglich bei 64% und einer Spezifität von 71% (51). Die systemische Therapie mit Chemotherapeutika (z.B.: 5-Fluorouracil und Dacarbazin) hat eine geringe Ansprechrates (15 - 20%) (54), die Radiotherapie ist auf die lokale Tumorkontrolle und auf Palliativsituationen begrenzt (55, 56) und die Radioimmuntherapie ist nur bei einzelnen Patientengruppen vertretbar (26, 57). In der fortgeschrittenen Tumorkontrolle können neue Tyrosinkinaseinhibitoren, z.B. Vandetanib oder Cabozantinib, eingesetzt werden, welche jedoch unerwünschte toxische Nebenwirkungen

haben (58, 59) und somit nicht für alle Patienten mit progredienter maligner Neoplasie zu empfehlen sind.

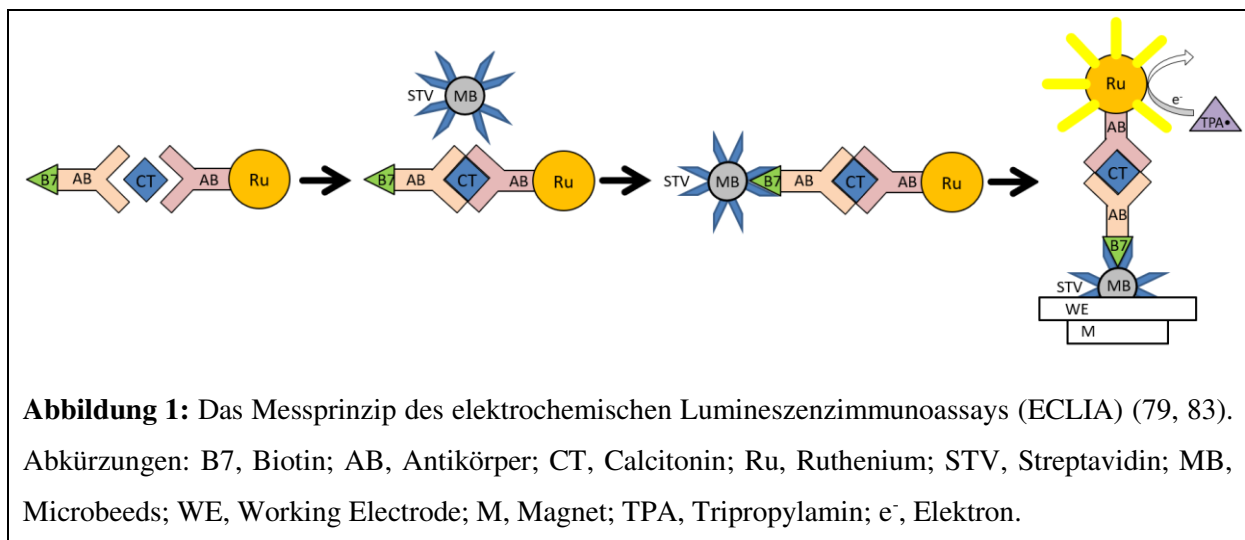
Ist der Zeitpunkt verstrichen, an dem eine Thyreoidektomie alleinig ausreichend ist, wird eine zusätzliche Lymphknotendisektion erforderlich. Bei Befall von 1 - 10 Lymphknoten sinkt die Heilungschance auf 31 - 57%, während sie bei >10 Lymphknotenmetastasen bei 0 - 4% liegt (60). Vor diesem Hintergrund erscheinen die therapeutischen Möglichkeiten begrenzt, sodass der Primärtherapie einer vollständigen Thyreoidektomie zum richtigen Zeitpunkt und möglicher Disektion zervikaler Lymphknotenkompartimente im Kindesalter besondere Bedeutung zukommt. Je jünger das Kind ist, umso anspruchsvoller ist die Operation, weshalb die Komplikationsrate über der der Erwachsenen liegt (61, 62), sodass die Operation bis zum maximal möglichen Zeitpunkt verzögert werden sollte, nicht zuletzt auch deshalb, um durch Non-Compliance bei Kleinkindern eine manifeste Hypothyreose und Mikrosomie nach Thyreoidektomie zu verhindern (63). Präoperativ wird der Zeitpunkt der prophylaktischen Thyreoidektomie über die Höhe des CT im Serum, der *RET*-Mutation und der Sonografie bestimmt (26). So wird empfohlen, CT-Kontrollen entsprechend der Risikostratifizierungen vorzunehmen: ATA-HST <1, ATA-H 1 - 5 und ATA-MOD >5 Jahre (64). Postoperativ ist der Biomarker relevant für das Screening eines Rezidivs oder eines fortwährenden MTC nach abgeschlossener Operation (26). Im ersten postoperativen Jahr wird pro Quartal eine Kontrolle empfohlen, die im zweiten Jahr halbjährlich und danach jährlich lebenslang stattfinden sollte (44). Patienten mit einem basalen CT-Spiegel unter der Nachweisgrenze nach vollständiger Thyreoidektomie gelten als biochemisch geheilt und haben eine 10-Jahresüberlebensrate von 97,7% (65). Nichtsdestotrotz besteht dennoch ein 3% Restrisiko, dass innerhalb der folgenden 7,5 Jahre der CT-Spiegel erneut ansteigt (66). Eine biochemische Heilung wurde bei Patienten mit präoperativen CT-Werten von <40ng/L berichtet (67). Jedoch gibt es keine generell akzeptierten Kriterien, ab welcher CT-Konzentration im Serum eine Thyreoidektomie erforderlich wird, da verschiedene Assays und die Heterogenität des MTCs eine einheitliche Definition erschweren (26).

Mit zunehmender Tumorgroße steigt auch die Konzentration von CT im Serum, sodass bei Konzentrationen ab ca. 100ng/L ein Nodulus in der Glandula Thyroidea palpabel ist (68). Der positive prädiktive Wert, dass es sich hierbei um ein MTC handelt, liegt bei 100%. In den CT-Intervallen von 50 - 100ng/L und 20 - 50ng/L beträgt er 25% und 8,3% (69). Lymphknotenmetastasen mit einer CT Messung <30ng/L wurden bisher nicht berichtet (64). CT gilt als der sensitivste und spezifischste biochemische Marker in der Diagnostik des MTC

(70). Mithilfe des Laborparameters CT können der optimale Zeitpunkt und Umfang der Thyreoidektomie bestimmt werden (67). Die Labordiagnostik ist der Sonographie überlegen (71, 72). CT ist somit für die präoperative (67, 72, 73) und postoperative Therapiesteuerung (26) von zentraler Bedeutung. Nach Empfehlung der ATA ist die einfache Überschreitung des oberen Referenzwertes als Richtwert für die Schilddrüsenentfernung indiziert (26). Problematisch ist, dass es keinen Konsens über die Referenzwerte gibt, ab wann man im Kindesalter von einem erhöhten CT spricht. Dies führt dazu, dass Referenzwerte der Erwachsenen in der Pädiatrie Anwendung finden, weil sie vom Hersteller als validiert angegeben werden. In den Beipackzetteln der Herstellerfirmen findet sich der Hinweis, dass jedes Labor die Übertragbarkeit der Referenzwerte für die eigene Patientengruppe überprüfen und gegebenenfalls selbst ermitteln sollte (74). Bei Erwachsenen konnte eine Geschlechtsabhängigkeit, jedoch keine Altersabhängigkeit nachgewiesen werden, die auf die höhere Anzahl der C-Zellen bei Männern zurückgeführt werden konnte (75). Eine Altersabhängigkeit ist jedoch in der Pädiatrie von Relevanz und eine Geschlechtsabhängigkeit nachzuweisen, gelang bisher nicht (76, 77, 78). Anders als in der Endokrinologie des Erwachsenen sind Verläufe der CT-Referenzwerte in der Pädiatrie, im Besonderen in den ersten 3 - 4 Lebensjahren, sehr dynamisch. CT-Werte sind in diesem Zeitraum deutlich höher als im späteren Leben, was zum einen für einen biochemischen Regulationsmechanismus, aber auch für die Gefahr iatrogenen falsch positiver MTC-Diagnosen spricht. Deshalb ist es dem Pädiater kaum möglich zwischen pathogenen und physiologischen CT-Werten zu unterscheiden und die dringende Frage zum Zeitpunkt der prophylaktischen Thyreoidektomie zu beantworten. Auch weil sich Referenzwerte assayspezifisch unterscheiden und die ATA sich auf einen Assay bezieht, der kommerziell nicht mehr verfügbar ist (77).

Im Zuge technischen Fortschritts berichtete die Firma „Hitachi“ 2007 (79) über ein Messgerät, das klinisch chemische Messungen („cobas® c501“) und endokrinologische Messungen („cobas® e601“) auf einem Großgerät kombiniert („cobas® 6000 Analyzer“). Der Vertrieb und die Entwicklung der Testkits erfolgt über „Roche Diagnostics“. Der „Elecsys®“ Calcitoninassay zum „cobas® e601“ stellt auf Grundlage des ECLIA (Elektrochemischer Lumineszenzimmunoassay) den derzeit sensitivsten Immunoassay zum Nachweis erhöhter CT-Werte dar (70). Die Messmethode verzeichnete in den letzten Jahren einen zunehmenden Marktanteil in Deutschland (2016: 30,2%; 2018: 33,5%) (80), wodurch sie für diese Arbeit zusätzlich relevant wurde.

Der Test ist ein sogenannter Sandwichassay, der auf Grundlage der Antigen-Antikörperbindung beruht. In dem Einschrittverfahren werden nach Probenzugabe jeweils mit Biotin oder Ruthenium kovalent gebundene Antikörper hinzugesetzt. Die beiden Antikörper binden CT als Antigen. Im Anschluss werden mit Streptavidin beschichtete magnetische Mikropartikel hinzugegeben, welche die biotinylierten Antikörper binden (81). Das entstandene Reagenz wird in der Messezelle mit Hilfe eines Magneten an einer unter elektrischer Spannung stehenden Elektrode angezogen. Eine Lösung wird hinzugefügt, welche die überschüssigen Antikörper und weiteren Debris ausspült. Die Spüllösung enthält Tripropylamin, welches oxidativ mit dem an der Elektrode befindlichen Ruthenium wechselwirkt (82). Das angeregte Ruthenium gelangt unter Freigabe eines Photons wieder in den Grundzustand. Das Lumineszenzsignal wird durch wiederkehrende Oxidation amplifiziert (79). Das emittierte Lichtsignal wird durch einen Fotoelektronenvervielfacher linear zur Konzentration des Analyten aufgezeichnet und eignet sich somit zur quantitativen Messung (74, 79). Das Messprinzip eines ECLIA wurde für CT in Abbildung 1 zusammengefasst.



Der positive prädiktive Wert von gemessenem basalem CT entspricht dem von stimuliertem CT, sodass für die Diagnose eines MTC die Aussagekraft eines basalen CT genügt (22, 64, 67, 84). Ein hinreichend sensitiver Assay wird demnach vorausgesetzt, um die verschiedenen Isoformen zu unterscheiden. Neben reifem CT existieren das gewebsabhängige alternative Spliceprodukt CGRP, das vermehrt im Hypothalamus und peripheren Nervensystem (85) gebildet wird, Preprocalcitonin, Procalcitonin, Katalcalcin, Calcitonin-rezeptorstimulierendes-Peptid-1, Adrenomedullin und Amylin (19). Bei Patienten mit MTC findet man neben monomerem CT auch polymere Strukturen. Postoperativ kann das monomere CT hinweisend auf Tumorresiduen sein und eine unvollständige Thyreoidektomie suggerieren (86). Die

polymere Form wird durch intermolekulare Disulfidbrücken gebildet (87) und ist weniger bioverfügbar (88).

Analytisch zeigen sich weitere Herausforderungen: Die Höhe des CT-Messwertes muss Assay-spezifisch interpretiert werden. Dies kann man z.B. am obersten Grenzwert des Referenzbereichs bei erwachsenen Männern erkennen: 8,4ng/L („Immulite2000®“, „Siemens“), 9,52ng/L („cobas®“, „Roche Diagnostics“) oder 21ng/L (IRMA, „Scantibody Laboratories“) (19). Zu falsch niedrigen Werten kann der Hook Effekt führen, der, nach Angaben durch den Hersteller, bei sehr hohen Analytkonzentrationen ab 1µg/mL auftritt (89) und die Prognose des Patienten durch unterdiagnostizierte Patienten verschlechtert (90, 91). Durch die stark erhöhte Antigenkonzentration werden sämtliche Antikörper des Tests gebunden. Dadurch können keine vollständigen Antigen-Antikörper-Komplexe entstehen und nur eine verminderte Anzahl der Sandwich-Komplexe emittiert ein schwaches Lichtsignal, während der Großteil während des Spülvorgangs entsorgt wird. Falsch positive Werte findet man durch Kreuzreaktivitäten mit Molekülen ähnlicher Strukturen, wie z.B. Procalcitonin, (92, 70). Hinzu kommen falsch positive Messwerte durch heterophile Antikörper, indem die Antikörper ohne Analyten einen Sandwich-Komplex bilden oder zusammen mit dem Antigen wechselwirken und das Signal verstärken (93, 94). In diesem Fall ist eine Wiederholungsmessung mit dem gleichen Assay unnötig (89) und ein Präzipitat der Antikörper mit Polyethylenglycol 6000 (95) sowie ein Linearitätstest sollten durchgeführt werden. Falsch positive Messwerte sind auch durch die Bildung von Makro-CT möglich. Makromoleküle entstehen z.B. durch Glykosylierung, kovalente oder nicht-kovalente Bindungen zwischen dem Analyten und weiteren Peptiden oder Proteinen (96). Die Bildung von Makromolekülen (95) ist kein pathophysiologischer Einzelfall und konnte für weitere Laboranalyten wie z.B. Prolaktin (96, 97, 98, 99), TSH (100, 101) oder FSH (102) beschrieben werden.

Präanalytisch gehört CT somit zu den herausforderndsten Analyten in der täglichen Routinediagnostik in der Laboratoriumsmedizin (19). Bei Raumtemperatur (20 - 25°C) beträgt die Haltbarkeit nur wenige Stunden, während sie bei Kühlschranktemperatur (2 - 8°C) bis auf ca. 24 Stunden verzögert werden kann (103). Um falsch niedrige Messwerte zu vermeiden, empfiehlt sich eine rasche Prozessierung oder eine Langzeitlagerung unter -40°C (70). Bei der Bewertung des Messwertes müssen auch physiologische, pathologische und pharmakologische Einflussfaktoren berücksichtigt werden (104), da sich CT-Spiegel unter physiologischen Bedingungen in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und Ethnie verändern. Die CT-Konzentration verringert sich mit zunehmendem Alter (67, 104, 105). Bei Jungen (105) und

Männern sind höhere CT-Spiegel nachweisbar als bei Mädchen und Frauen. Dies könnte mit der vermehrten Anzahl der C-Zellen bei Männern zusammenhängen (75). Des Weiteren sollte bei auffälligen Werten der zirkadiane Rhythmus mit maximaler Analytenkonzentration am Nachmittag und der Zeitpunkt der Nahrungsaufnahme berücksichtigt werden (106, 107). Stimuliert wird das Hormon auch durch Lifestylefaktoren, wie z.B. Rauchen (2), Alkoholkonsum (108) oder hochnormales Kortisol bei Disstress (107). CT-Werte von farbigen Probanden sind physiologisch leicht höher als bei Kaukasiern (109). Neben der benignen C-Zellhyperplasie und dem MTC sind weitere Pathologien mit einem erhöhten CT-Spiegel vergesellschaftet. So ist neben dem MTC CT auch bei M. Hirschsprung (110) oder Tumoren des Pulmo, des Kolons, des Pankreas, der Gaster und der Mammae erhöht (111), da sich diese Malignome aus neuroendokrinem Gewebe rekrutieren können (112). Auch sekundär kann CT über Gastrinome beim Zollinger-Ellison-Syndrom angeregt werden, weil Gastrin ein Stimulanz für die CT-Synthese ist. Des Weiteren ist auch Calcium ein Induktor, sodass die Hypercalcitoninämie durch Tumore, primären Hyperparathyreoidismus, Vitamin D-Metabolisierungsstörungen oder Niereninsuffizienz unterhalten wird (104). Die verminderte renale Clearance (113) führt bei einer chronischen Niereninsuffizienz um bis zu 30% erhöhte Messwerte (19). Hashimoto Thyreoiditis (114, 115) und Morbus Basedow (116, 117) sind ebenfalls mit erhöhten CT-Werten assoziiert, jedoch ist der Einfluss von Hashimoto Autoimmunthyreoiditis kontrovers, da Guesgen et al. (2013) (118) und Kratzsch et al. (2011) (70) keine positive Korrelation nachweisen konnten. Neben Erkrankungen müssen auch folgende Medikamente, die für eine direkte CT Induktion verantwortlich sind, berücksichtigt werden: Protonenpumpeninhibitoren und Histamine-2-Rezeptorblocker erhöhen den pH-Wert im Magen, wodurch Gastrin und respektive CT stimuliert werden (19). Aber auch die Gabe von Glukokortikoiden,  $\beta$ -Blockern, Glukagon, CGRP, Enteroglukagon, Cholezystokinin und Calcium (104) erhöht möglicherweise CT im Serum.

### **3.3.3 Carcinoembryonales Antigen, Procalcitonin und Chromogranin A**

In der Labordiagnose des MTC stellt CT den „Grundpfeiler“ dar und kann durch weitere Parameter ergänzt werden. Die Bestimmung des CEA als unspezifischer Tumormarker ist nicht sinnvoll in der Frühdiagnose des MTC, kann jedoch für die Progressionsdokumentation der Tumorerkrankung und das Follow-Up des Patienten von Bedeutung sein (119). Hierzu wird die Verdopplungszeit von CT und CEA herangezogen. Betragen die Verdopplungsraten unter 6 - 12 Monate, ist mit einem raschen Progress und einer erhöhten Mortalität zu rechnen, während

Verdopplungsraten >2 Jahre hinweisend auf eine sehr gute Überlebensrate sind (120, 121). Weiterhin könnte das PCT, mit vergleichbarer Aussagekraft wie das CT, in der Diagnostik des MTC Beachtung finden (70). Ein Vorteil des PCT ist, dass es bei 20 - 25°C länger als CT stabil bleibt (122). Nachteilig ist jedoch, dass eine Infektion des Patienten die Aussagekraft des PCT hinsichtlich seiner Sensitivität beeinflusst, sodass Werte über 50ng/L (123) hinterfragt und falsch positive Befunde für den Patienten verhindert werden sollten (70). Ebenso wie das CEA, ist CgA ein akzessorischer Labormarker (26, 124), der keinen Rückschluss auf das Tumorstadium oder eine frühzeitige Diagnose zulässt (125).

Kritisch zu betrachten ist die CT-Diagnostik im Zusammenhang mit dem nichtsekretoischen MTC, das mit einer Prävalenz von 0,83% auftritt (126) und die additive Bestimmung des *RET* sowie den hohen Stellenwert von Familienanamnese, körperlicher Untersuchung und Sonografie in der Vor- und Nachsorge pädiatrischer Patienten unterstreicht.

### **3.4 Etablierung von Referenzwerten für Calcitonin bei Kindern und Jugendlichen**

Die Etablierung von Referenzwerten von Säuglingen, Kleinkindern, Kindern und Jugendlichen gestaltet sich aufgrund kleiner Kohorten, verschiedener Analytik aufgrund unterschiedlicher Assays und schlecht untersuchter Präanalytik bislang zäh. Basuyau et al. (77) untersuchten 2004 insgesamt 151 Patienten einer hospitalisierten Kohorte mit einer Altersspanne zwischen 4 Monaten und 15 Jahren. Referenzwerte zwischen 0 - 6 Monate und 6 Monate - 3 Jahre wurden definiert. Danach wird die Nutzung des Referenzbereichs der Erwachsenen empfohlen. Die Bestimmung des CT im Serum erfolgte auf dem „Advantage®“-Immunoassaysystem der Firma „Nichols“. Angaben zum Zeitpunkt der Prozessierung der Probe, zu Lagerungsdauer, Lagerungstemperatur und Aussagen zur Exklusion von bestimmten Krankheiten sowie Medikamenten fehlen. Die Studie wird als Interpretationshilfe von pädiatrischen Patienten mit MTC von der ATA (2015) zitiert (26). Mit dem „Advantage®“ wurde 2006 eine zweite Studie von Verga et al. (76) mit 125 gesunden Probanden durchgeführt, in die Kinder zwischen 3 Monate und 16 Jahren einbezogen wurden. Eine Alters- und Geschlechtsabhängigkeit konnte innerhalb der Daten nicht nachgewiesen werden. Eine Unterteilung der CT-Referenzwerte vor und nach Pubertät sowie getrennt nach Geschlecht wurde postuliert. Die Proben wurden bei - 20°C gelagert, wobei Informationen zur Lagerungsdauer und Prozessierungszeit bis zur Messung fehlen. Auch sind Angaben zum Medikamentenausschluss defizitär. Beide Studien wurden wiederum mit dem „Advantage®“ der Firma „Nichols“ durchgeführt. Dieser Assay ist nicht mehr kommerziell verfügbar, sodass bis 2015 keine Studie zu CT-Referenzwerten mit



einem aktuellen Assay existierte. Castagna et al. (78) publizierten CT-Referenzwerte, die anhand von 2740 hospitalisierten Patienten im Alter zwischen 1 Monat und 16 Jahren ermittelt wurden. Die Bestimmung wurde mit dem „Immolute®“-Immunoassayautomaten („Siemens“) durchgeführt. Nach der Messung lagen 1053 Patienten über der Nachweisgrenze von  $<2\text{ng/L}$ . Messwerte unter  $2\text{ng/L}$  wurden statistisch extrapoliert. Eine Zeitangabe zur Probenprozessierung und Lagerungsdauer bei  $-20^{\circ}\text{C}$  fehlte. Es bleibt zum einen ungeklärt, ob neben Glukokortikoiden und Protonenpumpeninhibitoren weitere Medikamente ausgeschlossen wurden und zum anderen, ob die Exklusion bekannter CT-beeinflussender Erkrankungen nur anhand der positiven Familienanamnese oder auch auf aktueller Pathologien beruht. Ebenso blieb eine Validation der Referenzwerte aus. Der „Immolute®“ wurde 2018 nur in 35,7% von Einsenderlaboren für den „Referenzinstitut für Bioanalytik“-Ringversuch verwendet (80). Aus den oben genannten Restriktionen der verfügbaren Studien und den eingeschränkten verfügbaren Informationen ergaben sich die folgenden Aufgabenstellungen.

### **3.5 Aufgabenstellungen**

- Etablierung von alters- und geschlechtsabhängigen Referenzwerten für Calcitonin
- Untersuchung von medikamentösen und krankheitsbedingten Einflussfaktoren auf die Calcitoninhomöostase
- Validierung der neuen Referenzwerte gegenüber dem prä- und postoperativen Verlauf bei MEN 2 erkrankten Kindern
- Validierung der neuen Referenzwerte in Kindern mit Schilddrüsenerkrankungen mit der Fragestellung, ob die Schilddrüsenerkrankungen die CT-Spiegel beeinflussen

#### 4. Publikationsmanuskript

**Calcitonin measurement in pediatrics: reference ranges are gender-dependent, validation in medullary thyroid cancer and thyroid diseases**

Eckelt Felix, Vogel Mandy, Geserick Mandy, Kirsten Toralf, Bae Yoon Ju, Baber Ronny, Schaab Michael, Thiery Joachim, Pfaeffle Roland, Raue Friedhelm, Kiess Wieland, Kratzsch Juergen

Erschienen in: Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2019 Feb 22, [Epub ahead of print].

Felix Eckelt, Mandy Vogel, Mandy Geserick, Toralf Kirsten, Yoon Ju Bae, Ronny Baber, Michael Schaab, Joachim Thiery, Roland Pfaeffle, Friedhelm Raue, Wieland Kiess and Juergen Kratzsch\*

# Calcitonin measurement in pediatrics: reference ranges are gender-dependent, validation in medullary thyroid cancer and thyroid diseases

<https://doi.org/10.1515/cclm-2018-1186>

Received November 5, 2018; accepted December 16, 2018

## Abstract

**Background:** There is only limited information on serum reference ranges of calcitonin (CT) in infants, children and adolescents. This gap hampers valid diagnostics in patients with multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN 2) and planned prophylactic thyroidectomy. In addition, age-dependent reference ranges for CT are necessary to define a cure in medullary thyroid carcinoma (MTC). We asked whether the reference ranges for CT levels were age- and gender-dependent in the serum of a pediatric cohort.

**Methods:** A total of 6090 serum samples of 2639 subjects of the LIFE-Child cohort aged between 1 month and

17.9 years were analyzed by the CT electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA). Reference intervals were estimated using the LMS method. For clinical validation the serum of 28 patients (61 samples) with MEN 2 and 106 patients (136 samples) with thyroid diseases were analyzed.

**Results:** CT levels showed a clear age- and gender-dependence with significantly higher values in boys ( $p < 0.01$ ). An accelerated decline of CT levels from newborn to children at the age of 4 and 5 years was observed for both sexes. A cure for MTC was demonstrated in 71% of MEN 2 patients after thyroidectomy, whereas 5 patients remained suspicious for micrometastasis or relapse. Only 1.5% of our patients with thyroid diseases revealed increased CT levels.

**Conclusions:** This is the largest study to establish novel pediatric reference ranges from the CT values of healthy subjects. It allows a precise laboratory monitoring of CT in pediatric patients with MEN 2. Thyroid diseases did not have a relevant influence on CT levels in our pediatric cohort.

**Keywords:** calcitonin reference range; electrochemiluminescence immunoassay; medullary thyroid cancer; multiple endocrine neoplasia type 2; thyroid gland.

\*Corresponding author: Prof. Dr. rer. nat. Juergen Kratzsch, Institute of Laboratory Medicine, Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, University Hospital of Leipzig, Paul-List-Str. 13/15, 04103 Leipzig, Germany, Phone: +49 341/97 22241, E-mail: [juergen.kratzsch@medizin.uni-leipzig.de](mailto:juergen.kratzsch@medizin.uni-leipzig.de)

**Felix Eckelt, Yoon Ju Bae and Joachim Thiery:** Institute of Laboratory Medicine, Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, University Hospital of Leipzig, Leipzig, Germany

**Mandy Vogel, Mandy Geserick and Toralf Kirsten:** LIFE–Leipzig Research Centre for Civilization Diseases, University of Leipzig, Leipzig, Germany

**Ronny Baber:** Institute of Laboratory Medicine, Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, University Hospital of Leipzig, Leipzig, Germany; and LIFE–Leipzig Research Centre for Civilization Diseases, University of Leipzig, Leipzig, Germany

**Michael Schaab:** MVZ Laboratory Reising-Ackermann MD and Colleagues, Leipzig, Germany

**Roland Pfaeffle:** Hospital for Children and Adolescents, Centre for Paediatric Research, Department of Women and Child Health, University Hospital of Leipzig, Leipzig, Germany

**Friedhelm Raue:** Endocrine Practice, Molecular Genetic Laboratory, Heidelberg, Germany

**Wieland Kiess:** Hospital for Children and Adolescents, Centre for Paediatric Research, Department of Women and Child Health, University Hospital of Leipzig, Leipzig, Germany; and LIFE–Leipzig Research Centre for Civilization Diseases, University of Leipzig, Leipzig, Germany

## Introduction

Calcitonin (CT) is the most important and sensitive tumor marker of medullary thyroid cancer (MTC) [1–3]. About 3%–8% of thyroid cancer are MTC, a malignant tumor of the CT producing C-cell [2]; 75% of the tumors are sporadic and 25% hereditary as part of the multiple endocrine neoplasia type 2 syndrome (MEN 2). In patients with the hereditary form of this tumor CT is applied to determine the timing of prophylactic thyroidectomy [4]. Therefore, the availability of a valid reference range and especially of a clinically relevant upper cut-off is of importance. Nevertheless, CT is also used for screening and detecting persistent and recurrent pediatric MTC.

In *RET* germline mutation carriers the timing of prophylactic thyroidectomy is based on the type of the *RET* mutation and the result of CT levels [5]. Whereas reference data of CT provided for infants, children and adolescents are still rare, they were well established for adults by commercially available assay systems [1]. Accordingly, the reference data of adults were frequently used to interpret measurements of CT in pediatric patients. However, the dynamic age- and the so far defined lack of gender-dependency in pediatric subjects contradict findings in adults. Moreover, the American Thyroid Association (ATA) guidelines suggested in 2015 to consider CT reference ranges of children as proposed by Basuyau already in 2004 [5, 6]. However, this assay is no longer commercially available. In 2015 Castagna et al. [7] published reference data for CT in pediatric patients with the following limitations: 1. blood samples were stored frozen for an unknown time before analysis, although the long-term stability of serum CT at  $-20^{\circ}\text{C}$  remains to be questionable, 2. the used Immulite® system (Siemens) covers approximately 33% of the recent CT analysis with decreasing tendency [8], 3. subjects between 16 and 18 years were not investigated, 4. gender-dependence was not demonstrated, 5. a mixed population of different ethnicities may lead to a bias [9], 6. subjects were recruited from patients with non-thyroidal diseases which may lead to a bias in CT measurement, 7. the reference range was not validated for young MEN 2 patients. Moreover, thyroid diseases were lately exposed as an influencing factor on CT levels for adults [1] but no respective data are available for infants, children and adolescents.

Recently, the highly sensitive and reproducible electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) was adapted for the measurement of CT [10]. The aim our study was to establish reference ranges of serum CT in pediatric patients by overcoming the restrictions mentioned. In addition, the established CT reference ranges were validated in cohorts of young patients with MEN 2 as well as in pediatric patients with thyroid diseases.

## Materials and methods

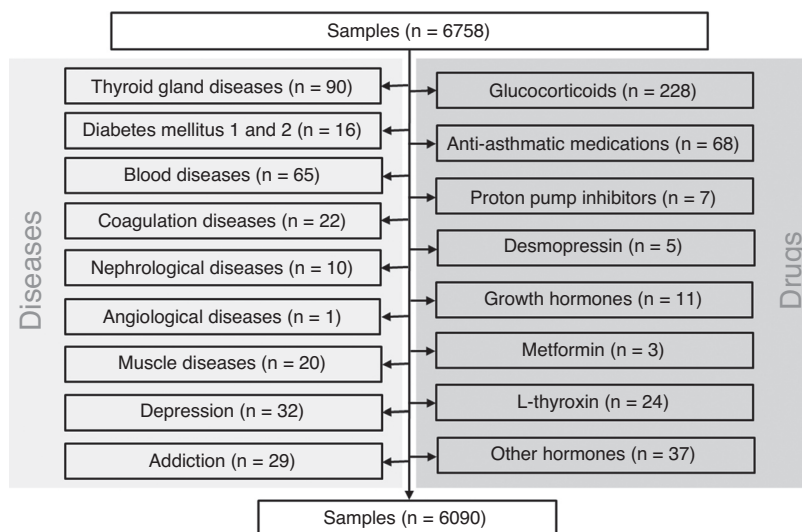
### Pediatric cohort for the establishment of CT reference ranges

Serum CT concentration was measured in subjects from the LIFE-Child study (Leipzig Research Centre for Civilization Diseases). LIFE-Child is a longitudinal population-based study in Leipzig, Germany [11, 12] aiming to examine civilization diseases. Subjects were recruited as a convenience sample [12] and consist of Caucasians. In total 6758 samples of infants, children and adolescents aged from 1 month to 18 years were selected.

Participants with potentially influenced CT homeostasis were excluded as reported in adults (Figure 1). Two thousand six hundred and thirty-nine subjects (1383 boys/1256 girls) with 6090 measurements (3279 boys/2811 girls) remained for further investigation. Accordingly, the declaration of Helsinki ethical principles were respected and all subjects had given informed consent [11].

### Clinical cohorts for the validation of CT reference ranges

The following cohorts of patients were included to validate diseases for potential confounding effects on CT concentration.



**Figure 1:** Exclusion criteria of potential influencing factors on CT serum concentrations for the establishment of reference values for CT in infants, children and adolescents.

- MEN 2: 28 patients (13 boys/15 girls) in aged between 6 months and 18 years (mean  $\pm$  SD:  $10.61 \pm 4.57$  years) delivered 61 blood withdrawals to monitor an individual follow-up for up to 2 years. The following *RET* mutations classified by ATA risk categories [5] were detected: highest risk: *RET* 918 ( $n=2$ ), high risk: *RET* 634 ( $n=18$ ), moderate risk: *RET* 804 ( $n=5$ ), *RET* 891 ( $n=1$ ), *RET* 620 ( $n=1$ ), *RET* 611 ( $n=1$ ). Preoperative data consisted of eight non-thyroidectomized patients with 13 CT measurements (4 boys [ $n=6$ ]/4 girls [ $n=7$ ]). Postoperatively 20 thyroidectomized patients contributed 48 CT measurements (9 boys [ $n=18$ ]/11 girls [ $n=30$ ]).
- Thyroid diseases: A total of 106 patients (45 boys/61 girls) with 136 serum CT measurements (57 boys/79 girls) from the Hospital of Children and Adolescents of the University Hospital Leipzig ( $n=51$ ), the LIFE-Child study ( $n=60$ ) and an outpatient clinic in Heidelberg ( $n=25$ ) were measured. Subjects with congenital and latent thyroid diseases were excluded. The patients were (mean  $\pm$  SD)  $12.24 \pm 4.27$  years old and ranged from 4 months to 17.88 years. The cohort consisted of newly diagnosed and treated thyroid diseases: Graves' disease ( $n=24$ , 11 boys/13 girls), hypothyroidism ( $n=42$ , 23 boys/19 girls), Hashimoto's thyroiditis ( $n=52$ , 16 boys/36 girls) and others like goiter, benign or malign thyroid diseases ( $n=18$ , 7 boys/11 girls).

Graves' disease was defined by levels of the thyrotropin receptor autoantibody above the cut-off 1.8 IU/L in blood serum. Hypothyroidism was diagnosed by hypothyroxinemia and increased thyroid-stimulating hormone (TSH). If hypothyroid patients also had increased thyroid peroxidase antibodies they were assigned to the Hashimoto thyroiditis group.

### Analyses of biomarkers

All CT measurements were performed on serum by the ECLIA method of the Cobas® system (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) within 2 h after blood withdrawal. The assay was standardized by the international reference preparation 89/620 of the World Health Organization (WHO). A detailed description of the complete analytical performance of this method was given recently [3]. The interassay coefficient of variation (CV) was below 5.9% for CT concentrations in the range between 11.2 ng/L and 84 ng/L. The lower limit of quantification (LLOQ) of the CT reference ranges was 0.5 ng/L as demonstrated by our in-house evaluation. A LLOQ of 1 ng/L was adopted for MEN 2 and thyroid cohorts as suggested by the Roche package insert. Germline *RET* mutation analysis was performed as described previously [13] in MEN 2 diagnosed pediatric subjects.

Analysis of the thyroid biomarkers TSH, free thyroxine (FT4) and thyroid peroxidase antibodies (TPOAb) was performed by the Cobas® 6000 assay system (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

### Statistical analysis

Descriptive statistics were performed using IBM SPSS 21. Coefficients of correlation “ $\rho$ ” between CT values and gender or age were estimated according to Spearman. Group comparisons between boys and girls or CT, age and LLOQ were calculated by the Mann-Whitney U-test. Subdivisions of age groups were made according to Harris

and Boyd [14]. R Version 3.4.4 [15] and R Studio Version 1.1.442 provided the necessary tools for data management, statistical analysis and diagrams (ggplot2 2.1.0.) [16]. The Generalized Additive Models for Location Scale and Shape package 5.0-6 (GAMLSS) [17] and the childsd package 0.6.7 [18] were used to estimate age-dependent percentile curves using LMS-type methods [19] as described in Vogel et al. [20]. Resampling from the same subjects was considered in the calculation of confidence levels marked by the shaded areas around the percentiles. Genetic interdependences of subjects were prevented by weighting and hampering family relationships. As the result, each measurement can be chosen with the same probability [20]. Appropriateness of the models was checked using Wormplots [21]. The numeric reference data and the LMS parameters were summarized in Supplemental Table 1.

## Results

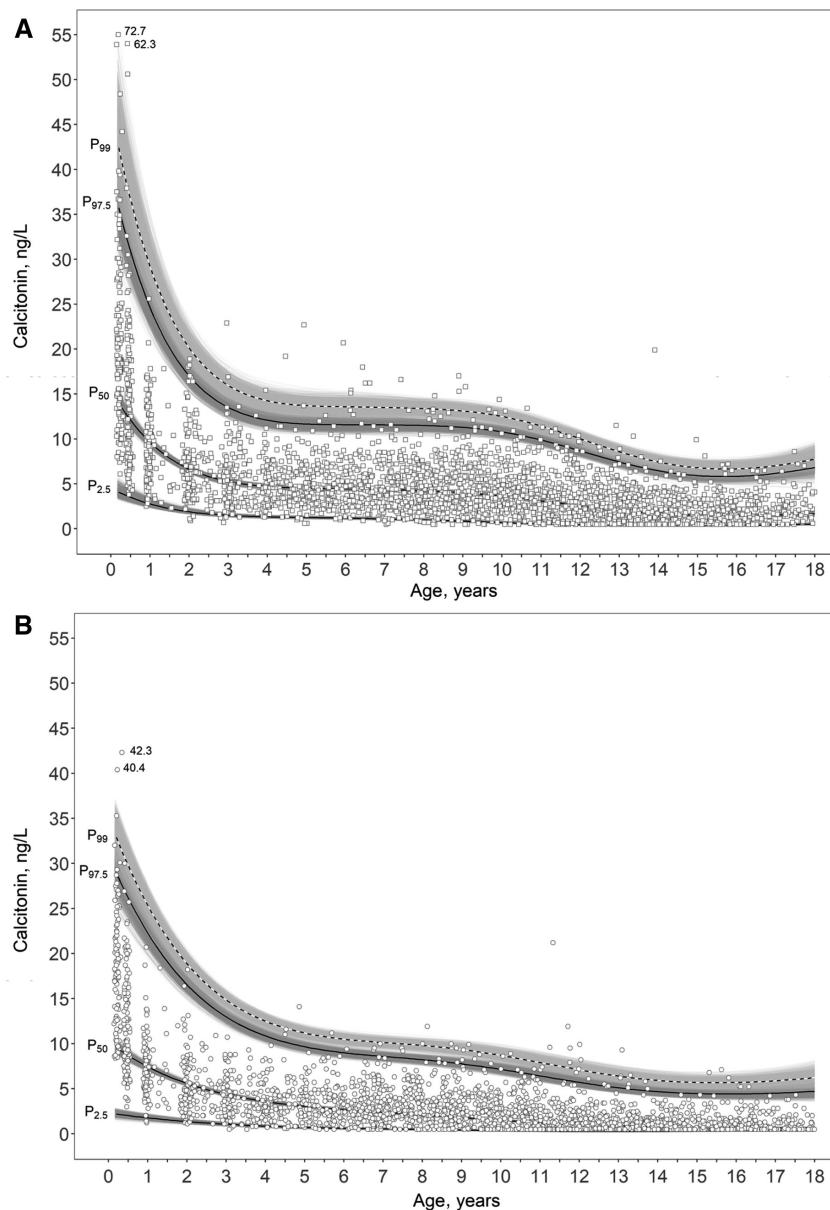
### Reference range

Gender dependence was shown for the CT in the whole pediatric reference data of 6090 samples from 2639 patients. Boys (mean  $\pm$  SD) demonstrated significantly higher CT concentrations than girls ( $5.35 \pm 5.49$  vs.  $3.58 \pm 4.42$  ng/L) between infancy and adolescence (U-test boys vs. girls:  $Z = -21.36$ ,  $p < 0.001$ , Table 1). According to Harris and Boyd [14], a gender-dependent subdivision of CT reference ranges between the age of 0.25 and 18 years was mandatory ( $Z = 15.92$ ,  $Z^* = 14.89$ ,  $Z > Z^*$  is true). This gender dependence was proved statistically for the age ranges between 0.25 and 12.5 years ( $Z = 13.3$ ,  $Z^* = 12.66$ ,  $Z > Z^*$  is true) and between 12.5 and 18 years ( $Z = 14.96$ ,  $Z^* = 7.85$ ,  $Z > Z^*$  is true).

Serum CT was significantly dependent on age ( $\rho = -0.646$ ,  $p < 0.001$ ) for the whole data set.

### Boys

The serum CT concentration of 3279 samples from 1383 boys was significantly age-dependent (Figure 2; median = 3.9 ng/L,  $\rho = -0.634$ ,  $p < 0.001$ ). During the first 4 years of life CT levels declined rapidly starting from 1 month of age (97.5th: 34.84 ng/L) until 4 years of age (97.5th: 12.09 ng/L). Between the ages of 4 and 9.5 years CT decreased moderately. Starting from 12.5 years of age, CT converged to the reference range of adults [3]. However, at 18 years of age the upper 95% confidence interval (CI) of the 97.5th percentile remained below the lower 95% CI of the 97.5th percentile from the German adult's reference values of 8.81 ng/L measured by the same ECLIA method [3]. Otherwise, the 99th percentile with 9.25 ng/L was within the



**Figure 2:** Serum CT measurements of healthy boys (A,  $n = 3279$ ) and girls (B,  $n = 2811$ ) in dependence on age are shown. A solid line indicates the 2.5th, 50th and 97.5th percentiles. The 99th percentile was shown as a dashed line. Resampling levels were marked by the shaded areas around the percentiles.

reference range for men. The number of CT concentrations at the LLOQ or below in boys was 155 (4.7%) and therefore lower than in girls with 17.1% ( $n = 482$ ).

## Girls

The serum CT concentration of 2811 samples from 1256 girls was significantly age-dependent as seen in boys (Figure 2; median = 2.2 ng/L,  $\rho = -0.695$ ,  $p < 0.001$ ). A rapid decline of CT levels was observed from the 3rd month of

age (97.5th: 28.45 ng/L) until 5 years of age (97.5th: 9.66 ng/L). Compared to boys a smaller decline was observed between 5 and 9.5 years of age. The CT descent below the 97.5th percentile of adults was observable at 13 years of age. In the upper 95% CI of the 97.5th percentile, the CT value of 5.56 ng/L overlapped with the lower 95% CI of the 97.5th percentile for the German adult's reference of 5.17 ng/L. The upper 95% CI of 99th percentile of 7.53 ng/L was higher than 6.4 ng/L as the 97.5th percentile of the German adult's reference data mentioned by Kahaly et al. [3].



## Pediatric patients with MEN 2

Clinical data of MEN 2 diagnosed patients were presented in Figure 3 and compared to our CT reference ranges:

- Pre-thyroidectomy: All except one of the measured CT values ( $n=13$ ) were within the new age- and gender-dependent reference values (2.5th–97.5th percentile). The respective follow-up data indicated a small increase of the CT concentration for one boy from 8.2 ng/L to 11 ng/L (*RET*: V804M). No further trend for elevated CT was observed in other patients: CT remained unchanged for 1 year at 3.7 ng/L (*RET*: C634G) and a small decrease (5 ng/L to 2.3 ng/L, *RET*: V804M) was recorded. Despite that all eight subjects had no clinical sign of MTC thyroidectomy was suggested in the boy with the mentioned increased CT (*RET*: V804M) [5].
- Post-thyroidectomy: The 20 patients were monitored by 48 CT measurements. Subjects after primary thyroidectomy ( $n=5$ , 2 boys/3 girls) contributed 17 CT measurements (ng/L): 1.6; 1.5; 1.8; 1.6 (boy 1, *RET*: C634Y, ATA high risk), 3.8 (boy 2, *RET*: C634Y, ATA high risk), <1.0; <1.0; <1.0; 1.2 (girl 1, *RET*: M918T, ATA highest risk), 36; 48; 68; 52 (girl 2, *RET*: M918T, ATA highest risk), 1.2; 1.3; 1.8, 1.8 (girl 3, *RET*: C634G, ATA high risk), and were therefore higher than the LLOQ of the assay. Girl 1 and girl 2 with MEN 2B were

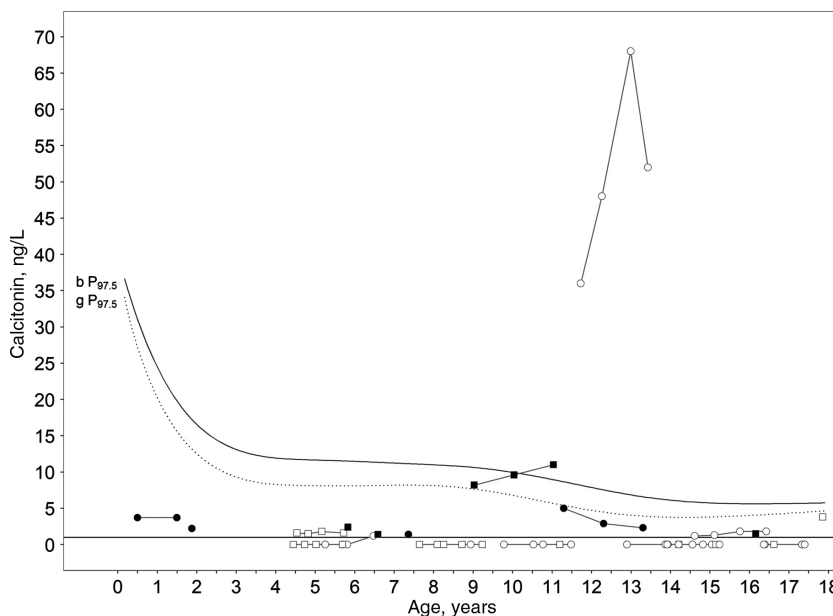
thyroidectomized in the age of 0.9 and 6 years, which was probably too late for a cure. The same could be true for boy 1 and girl 3 as well as for boy 2, who were thyroidectomized at 1.4, 7.6 and 7.4 years of age [5, 22]. Serum CT values of 15 thyroidectomized patients were below LLOQ ( $n=34$ ).

## Thyroid diseases as a confounding factor on CT concentrations

The CT values (mean  $\pm$  SD) of the patients with thyroid disease were  $3.11 \pm 4.7$  ng/L in boys ( $n=57$ ) and  $2.09 \pm 2.24$  ng/L in girls ( $n=79$ ), the total range was between <1 and 29.3 ng/L.

Only three boys (4.3%) of the Hashimoto's thyroiditis group demonstrated CT values higher than the 97.5th percentile: 29.3 ng/L at 0.9 years, 17.2 ng/L at 1.9 years and 14.0 ng/L at 3.9 years of age. In the hypothyroidism group only one measurement (1.4%) was 12.0 ng/L and therefore, above the 97.5th percentile at 14.6 years of age. For the girls diagnosed with Hashimoto's thyroiditis, two of them had CT values above the 97.5th percentile: 10.7 ng/L at 11.4 years and 6.6 ng/L at 12.4 years of age, respectively.

In total, 98.5% of the determined CT values were within the reference range ( $n=130$ ).



**Figure 3:** CT measurements of serum samples of children and adolescents with MEN 2 ( $n=61$ ): pre-thyroidectomy (boys ■:  $n=6$ ; girls ●:  $n=7$ ) and post-thyroidectomy (boys □:  $n=18$ ; girls ○:  $n=30$ ). The solid line indicates the LLOQ. CT concentrations of various visits for each subject were connected. The 97.5th percentile of the reference range was shown by a solid (boys) and dotted line (girls).

## Discussion

### Reference data for CT

Despite genetic testing for *RET*, CT measurement in serum is still inevitable for the diagnosis of sporadic and hereditary MTC [5]. Thus, the interpretation of CT concentrations remains crucial for MEN 2 patients, in particular for infants, children and adolescents, to determine the appropriate timing for prophylactic thyroidectomy [4].

So far, representative CT reference ranges for pediatric patients were available only from a couple of publications with small groups of investigated patients, questionable exclusion criteria and the use of assays which are no longer commercially available [6, 23].

In our study we aimed to overcome some restrictions of the only relevant pediatric reference study for CT by Castagna et al. published 2015 [7]. In detail, we used the CT assay of a recently developed highly precise ECLIA technology [24]. Additionally, our reference range study was based on a big cohort of well-characterized non-hospitalized infants, children and adolescents from the epidemiologic study LIFE-Child. Due to the exclusion of mixed ethnic groups [9], severe general and endocrine diseases and respective drugs used (Figure 1), a large unbiased healthy cohort for CT reference data could be obtained. We included 2639 subjects and therefore approximately the same number of subjects as the 2740 of Castagna et al., but we enhanced the number of data points by resampling by the factor 2.2–6090 measurements. Interestingly, using the Immulite® 2000 Xpi the Italian study revealed detectable CT values only in 38.5% ( $n=1053$ ) of the samples compared to 89.6% ( $n=5459$ ) of our samples. These contrasting values could be explained by a better analytical sensitivity of the ECLIA method or a somewhat different age-, gender- or ethnic-distribution of CT values from healthy compared to non-thyroid diseased infants, children and adolescents. Moreover, this study investigated the CT reference range until the age of 18 years and validated them for patients with MEN 2 and thyroid diseases.

### Age- and gender-dependence of the reference range

In contrast to reference ranges of adults, pediatric CT concentrations are higher until approximately 12.5 years of age and have to be interpreted in dependence of both, age and gender. In contrast, Castagna et al. reported CT reference values that converged into adult reference ranges [3] at 2 years of age for boys and 3 years of age for

girls [7]. Maximal CT concentrations during the whole life span were detectable in the first quarter of the first year of life (mean  $\pm$  SD:  $20.00 \pm 9.00$  ng/L, range: 6.1–72.7 ng/L, Table 1) for both genders. This finding appears to be independent on the CT measuring method as data from Immulite® (Siemens) and ours from Cobas® (Roche) were largely comparable [7]. According to the high dynamics of the CT data, reference cut-offs should be established quarterly during the first year of life, even if a gender-dependence could not be proved in the first quarter of life. In the second year a gender-dependent semiannually subdivision should be followed by an annually subdivision to optimally monitor *RET* triggered oncogenesis (Table 1).

The establishment of gender-dependent pediatric reference values may help to optimize the crucial period of thyroidectomy based on the MEN 2 mutation during the first 5 years of life or later [5]. Our results implied puberty to be related with a small but significantly gender-dependent CT for the first time. The fact that males have a higher number of C-cells than females [25] and stimulated CT secretion is higher in males compared to females [3, 26, 27] therefore, appears to also be valid in infants, children and adolescents (Figure 3A and B, Table 1). Moreover, we introduced the 99th percentile to present the “gray zone” that better determines the putative overlap of healthy and MTC data. Pediatric CT values of healthy subjects around this percentile could indicate an increased need for growth-associated calcium integration into bone compared to later life [28].

Interestingly, we found no clear consistency in the transition of our boy data to adult CT reference ranges [3]. A more restrictive exclusion of confounding factors and therefore decreased CT percentiles could explain this. Besides, it remains unclear if the modest CT increase during adolescence is an overinterpretation of the data or a slight but permanent slope to CT reference ranges of adults.

### CT concentrations of pediatric patients with MEN 2

CT is the most sensitive biomarker to diagnose MTC, accordingly the validation of CT measurements was mandatory in pediatric patients with MEN 2 [5].

Before thyroidectomy the ECLIA assay demonstrated reliable pathological and non-pathological basal CT concentrations for infants, children and adolescents with *RET* mutations based on the new pediatric age- and gender-dependent reference values. This finding suggested measurement of CT annually for the non-pathological cohort and it recommended thyroidectomy for CT



**Table 1:** CT reference ranges – 2.5th, 50th, 97.5th percentiles of both genders and their 95% CI are shown in dependence on age.

Age	Sex	n	CT, ng/L Mean $\pm$ SD (min–max)	P 2.5, ng/L CI (min–max)	P 50, ng/L CI (min–max)	P 97.5, ng/L CI (min–max)
3 mo	b	106	21.3 $\pm$ 10.3 (6.1–72.7)	4.0 (3.4–5.1)	13.7 (12.6–14.6)	34.8 (31.0–39.3)
	g	80	18.2 $\pm$ 6.6 (8.4–40.4)	2.2 (1.8–2.6)	9.4 (8.8–10.0)	28.5 (25.8–30.7)
6 mo	b	146	15.2 $\pm$ 8.7 (3.8–62.3)	3.5 (3.0–4.4)	12.0 (11.3–12.8)	30.9 (27.7–34.4)
	g	108	13.3 $\pm$ 6.7 (3.0–42.3)	2.0 (1.7–2.4)	8.7 (8.2–9.2)	26.2 (24.0–28.2)
9 mo	b	17	12.1 $\pm$ 5.9 (4.3–21.4)	3.1 (2.7–3.8)	10.8 (10.2–11.4)	27.5 (25.0–30.3)
	g	14	12.6 $\pm$ 5.9 (5.8–25.7)	1.9 (1.6–2.2)	8.0 (7.6–8.5)	24.1 (22.3–25.8)
12 mo	b	94	9.2 $\pm$ 4.3 (2.5–25.6)	2.8 (2.4–3.4)	9.6 (9.1–10.1)	24.6 (22.5–26.9)
	g	73	7.8 $\pm$ 3.6 (1.2–20.7)	1.8 (1.5–2.1)	7.4 (7.1–7.8)	22.3 (20.6–23.8)
1.5 y	b	35	9.4 $\pm$ 3.8 (2.9–17.8)	2.3 (2.0–2.7)	7.9 (7.5–8.2)	20.1 (18.6–21.8)
	g	27	6.9 $\pm$ 3.5 (2.8–18.4)	1.6 (1.3–1.8)	6.4 (6.1–6.7)	19.1 (17.9–20.2)
2 y	b	67	7.2 $\pm$ 3.6 (2.2–18)	1.9 (1.7–2.2)	6.6 (6.3–7.0)	17.0 (15.8–18.3)
	g	50	5.6 $\pm$ 3.3 (1.2–16.4)	1.4 (1.2–1.6)	5.6 (5.4–5.8)	16.5 (15.6–17.5)
3 y	b	147	6.3 $\pm$ 3.8 (0.7–22.9)	1.5 (1.4–1.7)	5.3 (5.0–5.5)	13.5 (12.6–14.5)
	g	121	4.7 $\pm$ 2.7 (1.1–18.2)	1.1 (0.9–1.2)	4.4 (4.2–4.6)	13.0 (12.3–13.7)
4 y	b	138	5.6 $\pm$ 3.1 (1.3–16.9)	1.3 (1.2–1.5)	4.7 (4.5–4.9)	12.1 (11.3–13.0)
	g	128	3.9 $\pm$ 2.2 (0.5–10.7)	0.9 (0.7–1.0)	3.6 (3.4–3.8)	10.9 (10.3–11.5)
5 y	b	161	5.2 $\pm$ 2.9 (0.6–22.7)	1.2 (1.1–1.4)	4.5 (4.3–4.7)	11.7 (10.9–12.5)
	g	116	3.5 $\pm$ 2.3 (0.6–14.1)	0.7 (0.6–0.8)	3.1 (2.9–3.2)	9.7 (9.2–10.2)
6 y	b	164	5.1 $\pm$ 2.7 (0.6–20.7)	1.2 (1.1–1.3)	4.4 (4.3–4.6)	11.6 (10.8–12.4)
	g	132	3.4 $\pm$ 2.1 (0.5–11.2)	0.6 (0.5–0.7)	2.7 (2.6–2.8)	9.0 (8.5–9.5)
7 y	b	177	5.0 $\pm$ 3.1 (0.9–18)	1.1 (1.0–1.2)	4.4 (4.2–4.6)	11.6 (10.8–12.3)
	g	171	3.3 $\pm$ 2.0 (0.5–10)	0.5 (0.5–0.6)	2.4 (2.3–2.5)	8.6 (8.2–9.0)
8 y	b	190	4.8 $\pm$ 2.6 (0.5–16.6)	1.0 (0.9–1.1)	4.2 (4.0–4.4)	11.5 (10.8–12.1)
	g	178	3.1 $\pm$ 1.8 (0.5–9.5)	0.5 (0.5–0.5)	2.1 (2.0–2.2)	8.2 (7.8–8.7)
9 y	b	236	4.8 $\pm$ 2.9 (0.5–17)	0.8 (0.7–1.0)	4.0 (3.8–4.2)	11.3 (10.7–11.9)
	g	174	3.0 $\pm$ 2.1 (0.5–11.9)	0.5 (0.5–0.5)	1.8 (1.7–1.9)	7.8 (7.3–8.3)
10 y	b	215	4.6 $\pm$ 2.8 (0.5–15.8)	0.7 (0.6–0.8)	3.6 (3.5–3.8)	10.8 (10.2–11.4)
	g	178	2.8 $\pm$ 1.9 (0.5–9.9)	0.5 (0.5–0.5)	1.5 (1.4–1.6)	7.2 (6.7–7.7)
11 y	b	210	4.2 $\pm$ 2.5 (0.5–13.4)	0.5 (0.5–0.6)	3.1 (2.9–3.3)	9.9 (9.3–10.4)
	g	185	2.4 $\pm$ 1.8 (0.5–8.9)	0.5 (0.5–0.5)	1.2 (1.2–1.3)	6.4 (6.0–7.1)
12 y	b	221	3.6 $\pm$ 2.5 (0.5–11.3)	0.5 (0.5–0.5)	2.6 (2.4–2.7)	8.7 (8.1–9.2)
	g	183	2.0 $\pm$ 2.3 (0.5–21.2)	0.5 (0.5–0.5)	1.0 (1.0–1.1)	5.7 (5.3–6.3)
13 y	b	213	3.0 $\pm$ 2.1 (0.5–11.5)	0.5 (0.5–0.5)	2.1 (1.9–2.2)	7.4 (6.9–8.0)
	g	189	1.4 $\pm$ 1.3 (0.5–9.9)	0.5 (0.5–0.5)	0.9 (0.8–0.9)	5.1 (4.7–5.7)
14 y	b	210	2.4 $\pm$ 2.2 (0.5–19.9)	0.5 (0.5–0.5)	1.7 (1.6–1.8)	6.5 (5.9–7.0)
	g	194	1.2 $\pm$ 1.3 (0.5–9.3)	0.5 (0.5–0.5)	0.8 (0.7–0.8)	4.7 (4.3–5.2)
15 y	b	175	2.2 $\pm$ 1.6 (0.5–9.9)	0.5 (0.5–0.5)	1.5 (1.4–1.6)	5.9 (5.4–6.5)
	g	169	1.1 $\pm$ 0.9 (0.5–4.3)	0.5 (0.5–0.5)	0.7 (0.7–0.8)	4.5 (4.0–4.9)
16 y	b	178	1.8 $\pm$ 1.5 (0.5–8.1)	0.5 (0.5–0.5)	1.5 (1.3–1.6)	5.8 (5.2–6.5)
	g	146	1.1 $\pm$ 1.1 (0.5–7.1)	0.5 (0.5–0.5)	0.7 (0.6–0.7)	4.4 (4.0–4.9)
17 y	b	110	2.1 $\pm$ 1.5 (0.5–6.5)	0.5 (0.5–0.5)	1.5 (1.4–1.7)	6.2 (5.4–7.0)
	g	127	1.3 $\pm$ 1.1 (0.5–5.3)	0.5 (0.5–0.5)	0.7 (0.6–0.7)	4.5 (3.9–5.1)
18 y	b	69	2.6 $\pm$ 1.7 (0.5–8.6)	0.5 (0.5–0.6)	1.7 (1.5–1.9)	6.8 (5.7–8.0)
	g	68	1.1 $\pm$ 0.9 (0.5–4.3)	0.5 (0.5–0.5)	0.7 (0.6–0.7)	4.7 (4.0–5.6)

Quarterly in the first year, semiannually in the second and annually set age intervals afterwards describe the steep decline of serum CT.  
 Abbrev.: CT, calcitonin; mo, month; y, year; b, boy; g, girl; P, percentile; CI, confidence interval; min, minimum; max, maximum.

concentrations above the 97.5th percentile during further monitoring [5]. Fifteen of our 20 total thyroidectomized patients revealed CT concentrations below LLOQ of 1.0 ng/L which indicated a presently cured MTC. Measurable CT concentrations in the five leftover patients suggested an increasing probability of MTC persistence.

Nevertheless, the single value of 1.2 ng/L after three values below the LLOQ as shown in girl 1 was no clear sign of detectable CT and the measurement has to be confirmed. For the remaining four patients the detectable CT is an important prognostic message (Figure 3) as thyroid gland residuum and (micro)metastasis may not

be safely visualized by sonography or computer tomography and magnetic resonance imaging because of the low tumor mass [2, 5].

The measurement of basal CT levels represents a sufficiently safe decision tool for thyroidectomy in *RET* mutation carriers but also for the post-thyroidectomized follow-up if our new reference ranges were applied as a quantitative scale. Therefore, a CT stimulation test via calcium or pentagastrin appears to be neither necessary for the decision of thyroidectomy nor for the definition of a cure in MTC [5]. Periodically measured CT values below LLOQ give evidence of a cured state and were not generated for analytical reasons [29]. This suggestion seems to be valid for pediatric but also for adult patients [3] and has to be confirmed by more extensive studies.

## Thyroid diseases

Former findings of adult but not of pediatric patients revealed an increased frequency of pathological CT concentrations in subjects with Graves' disease [30, 31] and Hashimoto's thyroiditis [32, 33]. Thyroid diseases may tend to stimulate C-cells, due to local leukocyte migration and inflammation. Potentially for the same reason of local malformation in physiological tissue, cancerous diseases like MTC can be promoted, which is in accordance with literature for Hashimoto's thyroiditis [29], Graves' disease [31] and multinodular goiter [34]. However, our presented data indicated no evidence for an increased frequency of elevated CT concentrations. Therefore, the effects of thyroid diseases on CT levels seem to have a lower impact in a pediatric cohort, than in adults. To confirm this hypothesis further research with a higher number of pediatric subjects needs to be performed.

## Limitations of the study and conclusions

Unfortunately, only a restricted number of participants could be recruited between 7 and 9 months of age. However, our statistical smoothing method coped with these limited data. Furthermore, a slight circadian rhythm in the release of CT [35] was neglected for logistic reasons.

Heterophilic antibodies (HAb) leading to spuriously increased CT values [36] were not screened by our study. However, the ECLIA suppresses HAb activity by a build-in blocking reagent and therefore, this assay appeared to be less predisposed for HAb interference than others [37]. So

far, no data about ECLIA-related interfering HAbs have been published. Anyhow, if the symptoms of a patient remained contradictory to the CT results, we recommended the precipitation of antibodies with polyethylenglycol 6000 [38] and a linearity test with the respective sample.

We conclude that CT measurements of infants, children and adolescents must be interpreted age- and gender-dependent with awareness of the dynamic decrease of the CT levels. The CT ECLIA was suitable for decision-making of prophylactic thyroidectomy in *RET* mutations carriers and for post-thyroidectomized follow-up after complete thyroidectomy. Moreover, thyroid diseases as a confounder seem to have a lower impact on a pediatric cohort than on adults.

**Acknowledgments:** This work was supported by LIFE, which is financed by the excellence initiative of the Saxony Ministry of Science and Art, Saxony, Germany and the European Regional Development Fund of the European Union. The authors like to thank Roche for sponsoring CT assay kits. The excellent work by laboratory assistants of the ILM Leipzig was much appreciated.

**Author contribution:** All the authors have accepted responsibility for the entire content of this submission.

**Research funding:** This work was supported by LIFE, which is financed by the excellence initiative of the Saxony Ministry of Science and Art, Saxony, Germany and the European Regional Development Fund of the European Union.

**Employment or leadership:** None declared.

**Honorarium:** None declared.

**Competing interests:** The funding organization(s) played no role in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the report for publication.

## References

1. Bae YJ, Schaab M, Kratzsch J. Calcitonin as biomarker for the medullary thyroid carcinoma. *Recent Results Cancer Res* 2015;204:117–37.
2. Raue F, Frank-Raue K. Epidemiology and clinical presentation of medullary thyroid carcinoma. *Recent Results Cancer Res* 2015;204:61–90.
3. Kahaly GJ, Algeciras-Schimnich A, Davis TE, Diana T, Feldkamp J, Karger S, et al. [American and European multicenter prospective study for the analytical performance and clinical validation of a novel sensitive fully automated immunoassay for calcitonin](#). *Clin Chem* 2017;63:1489–96.
4. Elisei R, Romei C, Renzini G, Bottici V, Cosci B, Molinaro E, et al. The timing of total thyroidectomy in *RET* gene mutation carriers could be personalized and safely planned on the basis of serum

- calcitonin: 18 years' experience at one single center. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:426–35.
5. Wells SA Jr, Asa SL, Dralle H, Elisei R, Evans DB, Gagel RF, et al. Revised American Thyroid Association guidelines for the management of medullary thyroid carcinoma. *Thyroid* 2015;25:567–610.
  6. Basuyau JP, Mallet E, Leroy M, Brunelle P. Reference intervals for serum calcitonin in men, women, and children. *Clin Chem* 2004;50:1828–30.
  7. Castagna MG, Fugazzola L, Maino F, Covelli D, Memmo S, Sestini F, et al. Reference range of serum calcitonin in pediatric population. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:1780–4.
  8. Reference Institute for Bioanalytics. Surveys tumor markers 2016. Available at: [https://www.rfb.bio/cgi/displayAnaStats?rv\\_type=TM&rvTypeForDetails=TM&year=2016&rv\\_num=4&analyte=all&searchType=rv\\_type&anaV=19](https://www.rfb.bio/cgi/displayAnaStats?rv_type=TM&rvTypeForDetails=TM&year=2016&rv_num=4&analyte=all&searchType=rv_type&anaV=19). Accessed: 20 Jan 2019.
  9. Stevenson JC, Myers CH, Ajdukiewicz AB. Racial differences in calcitonin and katalcalcin. *Calcif Tissue Int* 1984;36:725–28.
  10. Imai K, Watari S, Sakazume T, Mitsuyama S. Clinical chemistry and immunoassay testing supporting the individual healthy life. *Hitachi Rev* 2008;57:1–7.
  11. Poulain T, Baber R, Vogel M, Pietzner D, Kirsten T, Jurkutat A, et al. The LIFE child study: a population-based perinatal and pediatric cohort in Germany. *Eur J Epidemiol* 2017;32:145–58.
  12. Quante M, Hesse M, Döhnert M, Fuchs M, Hirsch C, Sergeev E, et al. The LIFE child study: a life course approach to disease and health. *BMC Public Health* 2012;12:1021.
  13. Frank-Raue K, Rondot S, Hoeppner W, Goretzki P, Raue F, Meng W. Coincidence of multiple endocrine neoplasia types 1 and 2: mutations in the RET protooncogene and MEN1 tumor suppressor gene in a family presenting with recurrent primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4063–7.
  14. Harris EK, Boyd JC. On dividing reference data into subgroups to produce separate reference ranges. *Clin Chem* 1990;36:265–70.
  15. R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria. Available at: <https://www.R-project.org>. Accessed: 20 Jan 2019.
  16. RStudio Team. RStudio: integrated development environment for R. Available at: <http://www.rstudio.com>. Accessed: 20 Jan 2019.
  17. Rigby RA, Stasinopoulos DM. Generalized additive models for location, scale and shape. *Appl Statist* 2005;54:507–54.
  18. Vogel M. Childsds: data and methods around reference values in pediatrics. Available at: <https://CRAN.R-project.org/package=childsds>. Accessed: 20 Jan 2019.
  19. Cole TJ, Green PJ. Smoothing reference centile curves: the LMS method and penalized likelihood. *Stat Med* 1992;11:1305–19.
  20. Vogel M, Kirsten T, Kratzsch J, Engel C, Kiess W. A combined approach to generate reference values using unbalanced longitudinal data. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2017;30:767–73.
  21. van Buuren S, Fredriks M. Worm plot: a simple diagnostic device for modelling growth reference curves. *Stat Med* 2001;20:1259–77.
  22. Starenki D, Park JI. Pediatric medullary thyroid carcinoma. *J Pediatr Oncol* 2015;3:29–37.
  23. Verga U, Morpurgo PS, Vaghi I, Radetti G, Beck-Peccoz P. Normal range of calcitonin in children measured by a chemiluminescent two-site immunometric assay. *Horm Res* 2006;66:17–20.
  24. Roche Diagnostics. Elecsys® calcitonin fact sheet. Available at: [http://www.roche-diagnostics.ch/content/dam/corporate/roche-dia\\_ch/documents/broschueren/professional\\_diagnostics/serumarbeitsplatz/immunologie/schilddruesendiagnostik1/EN\\_EA\\_Calcitonin-FactSheet.pdf](http://www.roche-diagnostics.ch/content/dam/corporate/roche-dia_ch/documents/broschueren/professional_diagnostics/serumarbeitsplatz/immunologie/schilddruesendiagnostik1/EN_EA_Calcitonin-FactSheet.pdf). Accessed: 20 Jan 2019.
  25. Guyétant S, Rousselet MC, Durigon M, Chappard D, Franc B, Guerin O, et al. Sex-related c-cell hyperplasia in the normal human thyroid: a quantitative autopsy study. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:42–7.
  26. D'Herbomez M, Caron P, Bauters C, Do Cao C, Schlienger JL, Sapin R, et al. Reference range of serum calcitonin levels in humans: influence of calcitonin assays, sex, age, and cigarette smoking. *Eur J Endocrinol* 2007;157:749–55.
  27. Machens A, Hoffmann F, Sekulla C, Dralle H. Importance of gender-specific calcitonin thresholds in screening for occult sporadic medullary thyroid cancer. *Endocr Relat Can* 2009;16:1291–8.
  28. Klein GL, Wadlington EL, Collins ED, Catherwood BD, Deftos LJ. Calcitonin levels in sera of infants and children: relations to age and periods of bone growth. *Calcif Tissue Int* 1984;36:635–8.
  29. Kratzsch J, Petzold A, Raue F, Reinhardt W, Bröcker-Preuss M, Görges R, et al. Basal and stimulated calcitonin and procalcitonin by various assays in patients with and without medullary thyroid cancer. *Clin Chem* 2011;57:467–74.
  30. Diklić A, Paunović I, Batev N, Malenković V, Havelka M, Janković R. Occurrence of thyroid gland carcinoma in graves-basedow disease. *Acta Chir Jugosl* 1991;38:61–8.
  31. Ardito G, Mantovani M, Vincenzoni C, Guidi ML, Corsello S, Rabitti C, et al. Hyperthyroidism and carcinoma of the thyroid gland. *Ann Ital Chir* 1997;68:23–7.
  32. Uwaifo GI, Remaley AT, Stene M, Reynolds JC, Yen PM, Snider RH, et al. A case of spurious hypercalcitoninemia: a cautionary tale on the use of plasma calcitonin assays in the screening of patients with thyroid nodules for neoplasia. *J Endocrinol Invest* 2001;24:361–9.
  33. Barbot N, Guyétant S, Beldent V, Akkras A, Cerf I, Perdrisot R, et al. Chronic autoimmune thyroiditis and c-cell hyperplasia. study of calcitonin secretion in 24 patients. *Ann Endocrinol (Paris)* 1991;52:109–12.
  34. Horvit PK, Gagel RF. The goitrous patient with an elevated serum calcitonin-what to do? [Editorial] *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:335–7.
  35. Zayed AA, Alzubaidi M, Atallah S, Momani MS, Al-Delaimy WK. Should food intake and circadian rhythm be considered when measuring serum calcitonin level? *Endocr Pract* 2013;19:620–6.
  36. Giovanella L, Suriano S. Spurious hypercalcitoninemia and heterophilic antibodies in patients with thyroid nodules. *Head Neck* 2011;33:95–7.
  37. Bories PN, Broutin A, Delette A, Labelle G, Popovici T. Comparison of the Elecsys calcitonin assay with the Immulite 1000 assay. describing one case with heterophilic antibody interference. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:e45–7.
  38. Alves TG, Kasamatsu TS, Yang JH, Meneghetti MC, Mendes A, Kunii IS, et al. Macrocalcitonin is a novel pitfall in the routine of serum calcitonin immunoassay. *J Clin Endocrinol Metab* 2016;101:653–8.

**Supplementary Material:** The online version of this article offers supplementary material (<https://doi.org/10.1515/cclm-2018-1186>).

**Supplemental Table 1:** The 2.5<sup>th</sup> and 97.5<sup>th</sup> percentile and  $\mu$ ,  $\sigma$ ,  $v$  and  $\tau$  for CT reference ranges in 3279 boys and 2811 girls was presented.

Age	Sex	P 2.5 (ng/L)	P 97.5 (ng/L)	$\mu$	$\sigma$	$v$	$\tau$
<b>3 mo</b>	b	4.0	34.8	13.65	0.53	0.26	1.68
	g	2.2	28.5	3.42	4.80	1.14	1.09
<b>6 mo</b>	b	3.5	30.9	12.10	0.53	0.26	1.69
	g	2.0	26.2	3.32	4.40	1.11	1.08
<b>9 mo</b>	b	3.1	27.5	10.76	0.53	0.26	1.69
	g	1.9	24.1	3.21	4.04	1.08	1.07
<b>12 mo</b>	b	2.8	24.6	9.62	0.53	0.26	1.70
	g	1.8	22.3	3.11	3.71	1.05	1.06
<b>1.5 y</b>	b	2.3	20.1	7.86	0.53	0.26	1.71
	g	1.6	19.1	2.90	3.15	1.00	1.04
<b>2 y</b>	b	1.9	17.0	6.64	0.53	0.26	1.72
	g	1.4	16.5	2.70	2.70	0.94	1.01
<b>3 y</b>	b	1.5	13.5	5.26	0.54	0.27	1.75
	g	1.1	13.0	2.32	2.04	0.86	0.97
<b>4 y</b>	b	1.3	12.1	4.71	0.54	0.27	1.79
	g	0.9	10.9	1.99	1.62	0.81	0.93
<b>5 y</b>	b	1.2	11.7	4.52	0.55	0.28	1.84
	g	0.7	9.7	1.71	1.33	0.80	0.89
<b>6 y</b>	b	1.2	11.6	4.44	0.56	0.29	1.90
	g	0.6	9.0	1.47	1.11	0.81	0.86
<b>7 y</b>	b	1.1	11.6	4.36	0.58	0.30	1.98
	g	0.5	8.6	1.25	0.93	0.84	0.82
<b>8 y</b>	b	1.0	11.5	4.23	0.60	0.31	2.09
	g	0.5	8.2	1.04	0.76	0.88	0.79
<b>9 y</b>	b	0.8	11.3	4.00	0.64	0.32	2.24
	g	0.5	7.8	0.84	0.61	0.92	0.75
<b>10 y</b>	b	0.7	10.8	3.63	0.68	0.31	2.44
	g	0.5	7.2	0.67	0.48	0.96	0.72
<b>11 y</b>	b	0.5	9.9	3.11	0.73	0.29	2.72
	g	0.5	6.4	0.53	0.36	0.98	0.69
<b>12 y</b>	b	0.5	8.7	2.55	0.77	0.25	3.08

	g	0.5	5.71	0.44	0.27	1.00	0.66
<b>13 y</b>	b	0.5	7.4	2.05	0.81	0.21	3.52
	g	0.5	5.1	0.39	0.21	1.01	0.64
<b>14 y</b>	b	0.5	6.5	1.70	0.82	0.15	4.05
	g	0.5	4.7	0.37	0.16	1.02	0.61
<b>15 y</b>	b	0.5	5.9	1.50	0.81	0.08	4.67
	g	0.5	4.5	0.37	0.12	1.04	0.58
<b>16 y</b>	b	0.5	5.8	1.46	0.80	0.01	5.40
	g	0.5	4.4	0.37	0.10	1.06	0.56
<b>17 y</b>	b	0.5	6.2	1.53	0.77	-0.07	6.25
	g	0.5	4.5	0.38	0.08	1.08	0.54
<b>18 y</b>	b	0.5	6.8	1.68	0.74	-0.14	7.25
	g	0.5	4.7	0.38	0.06	1.12	0.52

CT, calcitonin; mo, month; y, year; P, percentile; b, boy; g, girl.

## 5. Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

Titel: Calcitonin in Diagnostik und Therapie des hereditären medullären Schilddrüsenkarzinoms bei Kindern und Jugendlichen

eingereicht von:

Felix Eckelt

angefertigt an der:

Universität Leipzig, Medizinische Fakultät,

Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik

betreut von:

Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Kratzsch

eingereicht im Juli 2019

Die Definition von CT-Referenzintervallen in der Pädiatrie ist für den behandelnden Arzt und den betroffenen Patienten von hohem Stellenwert, um die Thyreoidektomie beim medullären Schilddrüsenkarzinom zeitgerecht einzuleiten. Weiterhin birgt der Laborwert die Möglichkeit einer Prädiktion für den möglichen Krankheitsverlauf. Die Therapie wird je nach Höhe des CT im Serum eingeleitet oder entsprechend der *RET*-Mutation vorerst konservativ geführt.

Die einzige aktuelle CT-Referenzwertstudie beruht auf Messungen mit dem „Immolute®“-Immunoassayvollautomaten der Firma „Siemens“. Aufgrund der folgenden Limitationen sind die Daten nur eingeschränkt nutzbar. Die CT-Referenzwerte wurden an einer hospitalisierten pädiatrischen Kohorte mit unklaren Probenlagerungsbedingungen und Prozessierungszeiten sowie unvollständig definierten Exklusionskriterien durchgeführt. Weiterhin wurden

extrapolierte Messwerte unter der Nachweisgrenze genutzt. Die Methode wurde 2018 nur zu 35,7% von Einsenderlaboren für den „Referenzinstitut für Bioanalytik“-Ringversuch verwendet (80).

Der ECLIA ist der derzeit sensitivste Assay zum Nachweis von CT, dessen Technologie für die Erstellung der CT-Referenzwerte für die bisher umfangreichste Studie dieser Thematik herangezogen wurde. Durch die LIFE-Child-Kohorte war es möglich, ein phänotypisch gesundes Probandenkollektiv zu rekrutieren, das zur Referenzwerterstellung hinzugezogen werden konnte. Aufgrund der Infrastrukturen des LIFE-Forschungsprojektes und der zugehörigen Biobank war es möglich, die CT-Proben standardisiert zu gewinnen und innerhalb von zwei Stunden im Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik zu bestimmen oder aufzubewahren. Mithilfe umfangreicher Literaturrecherchen wurden Einflussfaktoren auf die CT-Werte im Serum identifiziert und ausgeschlossen. Die Probandenkohorte wurde hierdurch weiter selektiert. Statistisch wurden die Daten nach einem neuen Ansatz verarbeitet, der auf der LMS-Methode beruht und durch Vogel et al. publiziert wurde (127).

Während es bislang bekannt war, dass die CT-Konzentration bei Kindern im Serum altersabhängig ist, konnten wir nachweisen, dass CT auch geschlechtsabhängig im Blut konzentriert ist. Die Referenzwerte der Jungen und Mädchen konvergieren erst ab dem 12,5. respektive 13. Lebensjahr in die Normalwerte der Erwachsenen. Des Weiteren war bisher unbekannt, dass während der Pubertät der CT-Spiegel ein zweites Mal, allerdings weniger stark als nach der Geburt, absinkt. Die CT-Spiegel in der Pädiatrie verfügen somit über eine hohe Dynamik.

Die erstellten Referenzintervalle wurden erfolgreich an zwei Patientenkohorten validiert. Bei den MEN 2 erkrankten Kindern war es möglich zwischen gesunden, erkrankten und wiedererkrankten Patienten zu differenzieren. Während bei Erwachsenen Kontroverse bezüglich des Einflussfaktors von Schilddrüsenerkrankungen auf die CT-Spiegel besteht, konnten wir bei Kindern keinen Effekt auf die Höhe des Hormons im Serum nachweisen.

Die Studie hat folgende Limitationen: 3,6% der Blutentnahmen konnten nicht zwischen 6:00 Uhr und 10:00 Uhr durchgeführt werden, die letzte Probennahme erfolgte 14:55 Uhr. Da CT nur eine geringe zirkadiane Variation zeigt, erscheint ein Einfluss der späteren Probennahme auf die Referenzwerte als vernachlässigbar. Zudem konnte der vorausgesetzte Fastenzustand bei Kindern jünger als vier Jahren nicht immer realisiert werden. Weiterhin wurden aufgrund der eingeschränkten Verfügbarkeit des Probenmaterials die CT-Messungen nicht auf

Interferenzen mit heterophilen Antikörpern überprüft. Der ECLIA verfügt über ein integriertes Reagenz zur Blockierung von unspezifischen Antikörperreaktionen, sodass ein Risiko einer potentiellen Interferenz gering ist.

Es lässt sich schlussfolgern, dass CT-Messungen bei Säuglingen, Kleinkindern, Kindern und Adoleszenten alters- und geschlechtsabhängig interpretiert werden müssen. Der ECLIA ist in der Lage, Diagnose- und Therapiemonitoring beim MTC von pädiatrischen Patienten optimal zu unterstützen und den Zeitpunkt einer prophylaktischen Schilddrüsenentfernung bedarfsgerecht zu planen. Dabei scheinen Schilddrüsenerkrankungen einen geringeren Einfluss auf die CT-Spiegel von Kindern als von Erwachsenen zu haben.



## 6. Literaturverzeichnis

1. Copp DH, Cameron EC, Cheney BA, et al. Evidence for calcitonin - a new hormone from the parathyroid that lowers blood calcium. *Endocrinology* 1962; 70(5):638-49.
2. d'Herbomez M, Caron P, Bauters C, et al. Reference range of serum calcitonin levels in humans: influence of calcitonin assays, sex, age, and cigarette smoking. *Eur J Endocrinol* 2007; 157(6):749-55.
3. Friedman PA, Gesek FA. Cellular calcium transport in renal epithelia: measurement, mechanisms, and regulation. *Physiol Rev* 1995; 75(3):429-71.
4. Chambers TJ, McSheehy PM, Thomson BM, et al. The effect of calcium-regulating hormones and prostaglandins on bone resorption by osteoclasts disaggregated from neonatal rabbit bones. *Endocrinology* 1985; 116(1):234-9.
5. Chambers TJ, Moore A. The sensitivity of isolated osteoclasts to morphological transformation by calcitonin. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 57(4):819-24.
6. Nicholson GC, Moseley JM, Sexton PM, et al. Abundant calcitonin receptors in isolated rat osteoclasts. biochemical and autoradiographic characterization. *J Clin Invest* 1986; 78(2):355-60.
7. Davey RA, Findlay DM. Calcitonin: physiology or fantasy? *J Bone Miner Res* 2013; 28(5):973-9.
8. Wallach S, Rousseau G, Martin L, et al. Effects of calcitonin on animal and in vitro models of skeletal metabolism. *Bone* 1999; 25(5):509-16.
9. Okubo Y, Bessho K, Fujimura K, et al. Effect of calcitonin on osteoinduction by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 269(2):317-21.
10. Inzerillo AM, Zaidi M, Huang CL. Calcitonin: the other thyroid hormone. *Thyroid* 2002; 12(9):791-8.
11. Wei J, Wang J, Gong Y, Zeng R. Effectiveness of combined salmon calcitonin and aspirin therapy for osteoporosis in ovariectomized rats. *Mol Med Rep*. 2015; 12(2):1717-26.

12. Garrett JE, Tamir H, Kifor O, et al. Calcitonin-secreting cells of the thyroid express an extracellular calcium receptor gene. *Endocrinology* 1995; 136(11):5202-11.
13. Zaidi M, Moonga BS, Abe E. Calcitonin and bone formation: a knockout full of surprises. *J Clin Invest* 2002; 110(12):1769-71.
14. Felsenfeld AJ, Levine BS. Calcitonin, the forgotten hormone: does it deserve to be forgotten? *Clin Kidney J* 2015; 8(2):180-7.
15. Niall HD, Keutmann HT, Copp DH, et al. Amino acid sequence of salmon ultimobranchial calcitonin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1969; 64(2):771-8.
16. Copp DH. The discovery of calcitonin. *Bone Miner* 1992; 16(3):157-9.
17. Breimer LH, MacIntyre I, Zaidi M. Peptides from the calcitonin genes: molecular genetics, structure and function. *Biochem J* 1988; 255(2):377-90.
18. European Medicines Agency. Questions and answers on the review of calcitonin-containing medicines. Verfügbar auf:  
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/referrals/calcitonin>. Aufgerufen am:  
 31.03.2019.
19. Bae YJ, Schaab M, Kratzsch J. Calcitonin as biomarker for the medullary thyroid carcinoma. *Recent Results Cancer Res* 2015; 204:117-37.
20. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* 2019; 69(1):7-34.
21. Gacel RF, Hoff AO, Cote GJ. Werner & Ingbar's The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text. 9. Edition. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2005; 967–988.
22. Raue F, Frank-Raue K. Epidemiology and Clinical Presentation of Medullary Thyroid Carcinoma. *Recent Results Cancer Res* 2015; 204:61-90.
23. Raue F. German medullary thyroid carcinoma/multiple endocrine neoplasia registry. German MTC/MEN Study Group. *Medullary Thyroid Carcinoma/Multiple Endocrine Neoplasia Type 2*. *Langenbecks Arch Surg* 1998; 383(5):334-6.
24. Raue F, Frank-Raue K. Update multiple endocrine neoplasia type 2. *Fam Cancer* 2010; 9(3):449-57.

25. Wells SA Jr, Pacini F, Robinson BG, et al. Multiple endocrine neoplasia type 2 and familial medullary thyroid carcinoma: an update. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98(8):3149-64.
26. Wells SA Jr, Asa SL, Dralle H, et al. Revised american thyroid association guidelines for the management of medullary thyroid carcinoma. *Thyroid* 2015; 25(6):567-610.
27. Herold G, et al. *Innere Medizin*. Köln: Eigenverlag; 2013; 761-2.
28. Machens A, Hinze R, Thomusch O, et al. Pattern of nodal metastasis for primary and reoperative thyroid cancer. *World J Surg* 2002; 26(1):22-8.
29. Pacini F, Castagna MG, Cipri C, Schlumberger M. Medullary thyroid carcinoma. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2010; 22(6):475-85.
30. American Thyroid Association Guidelines Task Force, Kloos RT, Eng C, et al. Medullary thyroid cancer: management guidelines of the American Thyroid Association. *Thyroid* 2009; 19(6):565-612.
31. Edge SB, Compton CC. The american joint committee on cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol* 2010; 17(6):1471-4.
32. de Groot JW, Plukker JT, Wolffenbuttel BH, et al. Determinants of life expectancy in medullary thyroid cancer: age does not matter. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 65(6):729–736.
33. Kebebew E, Ituarte PH, Siperstein AE, et al. Medullary thyroid carcinoma: clinical characteristics, treatment, prognostic factors, and a comparison of staging systems. *Cancer* 2000; 88(5):1139-48.
34. Raue F. German medullary thyroid carcinoma/multiple endocrine neoplasia registry. German MTC/MEN Study Group. Medullary thyroid carcinoma/ multiple endocrine neoplasia type 2. *Langenbecks Arch Surg* 1998; 383(5):334-6.
35. Starenki D, Park JI. Pediatric medullary thyroid carcinoma. *J Pediatr Oncol* 2015; 3(2):29-37.
36. Pachnis V, Mankoo B, Costantini F. Expression of the c-ret proto-oncogene during mouse embryogenesis. *Development* 1993 Dec; 119(4):1005-17.
37. Takahashi M, Ritz J, Cooper GM. Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement. *Cell* 1985; 42(2):581-8.
38. Raue F, Rondot S, Schulze E, et al. Clinical utility gene card for: multiple endocrine neoplasia type 2. *Eur J Hum Genet* 2012; 20(1).

39. Margraf RL, Crockett DK, Krautscheid PM, et al. Multiple endocrine neoplasia type 2 RET protooncogene database: repository of MEN2-associated RET sequence variation and reference for genotype/phenotype correlations. *Hum Mutat* 2009; 30(4):548-56.
40. Quayle FJ, Fialkowski EA, Benveniste R, et al. Pheochromocytoma penetrance varies by RET mutation in MEN 2A. *Surgery* 2007; 142(6):800-5; discussion 805.e1.
41. Eng C, Clayton D, Schuffenecker I, et al. The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. International RET mutation consortium analysis. *JAMA* 1996; 276(19):1575-9.
42. Frank-Raue K, Rondot S, Hoepfner W, et al. Coincidence of multiple endocrine neoplasia types 1 and 2: mutations in the RET protooncogene and MEN1 tumor suppressor gene in a family presenting with recurrent primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(7):4063-7.
43. Elisei R, Romei C, Cosci B, et al. RET genetic screening in patients with medullary thyroid cancer and their relatives: experience with 807 individuals at one center. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(12):4725-9.
44. Friedhelm Raue, Karin Frank-Raue. Update on multiple endocrine neoplasia type 2: focus on medullary thyroid carcinoma. *J Endocr Soc* 2018; 2(8):933-943.
45. Hansford JR, Mulligan LM. Multiple endocrine neoplasia type 2 and RET: from neoplasia to neurogenesis. *J Med Genet* 2000; 37(11):817-27.
46. Moore SW, Appfelstaedt J, Zaahl MG. Familial medullary carcinoma prevention, risk evaluation, and RET in children of families with MEN2. *J Pediatr Surg* 2007;42(2):326-32.
47. Valenciaga A, Grubbs EG, Porter K, et al. Reduced Retinoblastoma Protein Expression Is Associated with Decreased Patient Survival in Medullary Thyroid Cancer. *Thyroid* 2017; 27(12):1523-1533.
48. Puppin C, Durante C, Sponziello M, et al. Overexpression of genes involved in miRNA biogenesis in medullary thyroid carcinomas with RET mutation. *Endocrine* 2014; 47(2):528-36.
49. Abraham D, Jackson N, Gundara JS, et al. MicroRNA profiling of sporadic and hereditary medullary thyroid cancer identifies predictors of nodal metastasis, prognosis, and potential therapeutic targets. *Clin Cancer Res* 2011; 17(14):4772-81.

50. Ciampi R, Mian C, Fugazzola L, et al. Evidence of a low prevalence of RAS mutations in a large medullary thyroid cancer series. *Thyroid* 2013; 23(1):50-7.
51. Moley JF, DeBenedetti MK. Patterns of nodal metastases in palpable medullary thyroid carcinoma: recommendations for extent of node dissection. *Ann Surg* 1999; 229(6):880-7; discussion 887-8.
52. Pelizzo MR, Boschin IM, Bernante P, et al. Natural history, diagnosis, treatment and outcome of medullary thyroid cancer: 37 years experience on 157 patients. *Eur J Surg Oncol* 2007; 33(4):493-7.
53. Scollo C, Baudin E, Travagli JP et al. Rationale for central and bilateral lymph node dissection in sporadic and hereditary medullary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(5):2070-5.
54. Bajetta E, Rimassa L, Carnaghi C, et al. 5-Fluorouracil, dacarbazine, and epirubicin in the treatment of patients with neuroendocrine tumors. *Cancer* 1998; 83(2):372-8.
55. Deftos LJ, Stein MF. Radioiodine as an adjunct to the surgical treatment of medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1980; 50(5):967-8.
56. Schwartz DL, Rana V, Shaw S, et al. Postoperative radiotherapy for advanced medullary thyroid cancer--local disease control in the modern era. *Head Neck* 2008; 30(7):883-8.
57. Iten F, Müller B, Schindler C, et al. Response to [90Yttrium-DOTA]-TOC treatment is associated with long-term survival benefit in metastasized medullary thyroid cancer: a phase II clinical trial. *Clin Cancer Res* 2007; 13(22 Pt 1):6696-702.
58. Wells SA Jr, Robinson BG, Gagel RF, et al. Vandetanib in patients with locally advanced or metastatic medullary thyroid cancer: a randomized, double-blind phase III trial. *J Clin Oncol* 2012; 30(2):134-41.
59. Elisei R, Schlumberger MJ, Müller SP, et al. Cabozantinib in progressive medullary thyroid cancer. *J Clin Oncol* 2013; 31(29):3639-46.
60. Machens A, Gimm O, Ukkat J, et al. Improved prediction of calcitonin normalization in medullary thyroid carcinoma patients by quantitative lymph node analysis. *Cancer* 2000; 88(8):1909-15.
61. Sosa JA, Tuggle CT, Wang TS, et al. Clinical and economic outcomes of thyroid and parathyroid surgery in children. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(8):3058-65.

62. Tuggle CT1, Roman SA, Wang TS, et al. Pediatric endocrine surgery: who is operating on our children? *Surgery*. 2008; 144(6):869-77; discussion 877.
63. Frank-Raue K, Buhr H, Dralle H, et al. Long-term outcome in 46 gene carriers of hereditary medullary thyroid carcinoma after prophylactic thyroidectomy: impact of individual RET genotype. *Eur J Endocrinol* 2006; 155(2):229-36.
64. Rohmer V, Vidal-Trecan G, Bourdelot A, et al. Prognostic factors of disease-free survival after thyroidectomy in 170 young patients with a RET germline mutation: a multicenter study of the Groupe Francais d'Etude des Tumeurs Endocrines. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96(3):E509-18.
65. Modigliani E, Cohen R, Campos JM, et al. Prognostic factors for survival and for biochemical cure in medullary thyroid carcinoma: results in 899 patients. The GETC Study Group. Groupe d'étude des tumeurs à calcitonine. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998; 48(3):265-73.
66. Franc S, Niccoli-Sire P, Cohen R, et al. Complete surgical lymph node resection does not prevent authentic recurrences of medullary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2001; 55(3):403-9.
67. Opsahl EM, Brauckhoff M, Schlichting E, et al. A nationwide study of multiple endocrine neoplasia type 2A in Norway: predictive and prognostic factors for the clinical course of medullary thyroid carcinoma. *Thyroid* 2016; 26(9):1225-38.
68. Cohen R, Campos JM, Salaün C, et al. Preoperative calcitonin levels are predictive of tumor size and postoperative calcitonin normalization in medullary thyroid carcinoma. Groupe d'Etudes des Tumeurs a Calcitonine (GETC). *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(2):919-22.
69. Costante G, Meringolo D, Durante C, et al. Predictive value of serum calcitonin levels for preoperative diagnosis of medullary thyroid carcinoma in a cohort of 5817 consecutive patients with thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(2):450-5.
70. Kratzsch J, Petzold A, Raue F, et al. Basal and stimulated calcitonin and procalcitonin by various assays in patients with and without medullary thyroid cancer. *Clin Chem* 2011; 57(3):467-74.
71. Morris LF, Waguespack SG, Edeiken-Monroe BS, et al. Ultrasonography should not guide the timing of thyroidectomy in pediatric patients diagnosed with multiple endocrine neoplasia syndrome 2A through genetic screening. *Ann Surg Oncol* 2013; 20(1): 53-59.

72. Elisei R, Romei C, Renzini G, et al. The timing of total thyroidectomy in RET gene mutation carriers could be personalized and safely planned on the basis of serum calcitonin: 18 years experience at one single center. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97(2):426-35.
73. Bihan H, Becker KL, Snider RH, et al. Calcitonin precursor levels in human medullary thyroid carcinoma. *Thyroid*. 2003; 13(8):819-22.
74. Roche Diagnostics. Elecsys Calcitonin. Verfügbar auf: [https://pim-eservices.roche.com/eLD\\_SF/pi/en/PublicDocuments/GetDocument?documentId=4f6955a0-d8f6-e811-edbb-00215a9b3428](https://pim-eservices.roche.com/eLD_SF/pi/en/PublicDocuments/GetDocument?documentId=4f6955a0-d8f6-e811-edbb-00215a9b3428). Aufgerufen am: 31.03.2019.
75. Guyétant S, Rousselet MC, Durigon M, et al. Sex-related C cell hyperplasia in the normal human thyroid: a quantitative autopsy study. *J Clin Endocrinol Metab* 1997 Jan; 82(1):42-7.
76. Verga U, Morpurgo PS, Vaghi I, et al. Normal range of calcitonin in children measured by a chemiluminescent two-site immunometric assay. *Horm Res* 2006; 66(1): 17-20.
77. Basuyau JP, Mallet E, Leroy M, et al. Reference intervals for serum calcitonin in men, women and children. *Clinical Chemistry* 2004; 50(10): 1828-1830.
78. Castagna MG, Fugazzola L, Maino F, et al. Reference range of serum calcitonin in pediatric population. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100(5):1780-4.
79. Imai K, Watari S, Sakazume T, et al. Clinical chemistry and immunoassay testing supporting the individual healthy life. *Hitachi Rev* 2008; 57:1-7.
80. Reference Institute for Bioanalytics. Surveys tumor markers 2018. Verfügbar auf: [https://www.rfb.bio/cgi/displayAnaStats?rv\\_type=TM&rvTypeForDetails=TM&year=2018&rv\\_num=4&analyte=all&searchType=rv\\_type&anaV=19](https://www.rfb.bio/cgi/displayAnaStats?rv_type=TM&rvTypeForDetails=TM&year=2018&rv_num=4&analyte=all&searchType=rv_type&anaV=19). Aufgerufen am: 27.03.2019.
81. Kahaly GJ, Algeciras-Schimmich A, Davis TE, et al. United States and European multicenter prospective study for the analytical performance and clinical validation of a novel sensitive fully automated immunoassay for calcitonin. *Clin Chem* 2017; 63(9):1489-1496.
82. Erler K. Elecsys immunoassay systems using electrochemiluminescence detection. *Wien Klin Wochenschr* 1998; 110 Suppl 3:5-10.
83. Roche Diagnostics. Elecsys® calcitonin fact sheet. Verfügbar auf: [https://www.roche.de/res/content/7854/calcitonin\\_factsheet.pdf](https://www.roche.de/res/content/7854/calcitonin_factsheet.pdf). Aufgerufen am: 19.05.2019.

84. Machens A, Lorenz K, Dralle H. Individualization of lymph node dissection in RET (rearranged during transfection) carriers at risk for medullary thyroid cancer: value of pretherapeutic calcitonin levels. *Ann Surg* 2009; 250(2):305-10.
85. Felsenfeld AJ, Levine BS. Calcitonin, the forgotten hormone: does it deserve to be forgotten? *Clin Kidney J* 2015; 8(2):180-7.
86. Engelbach M, Heerdt S, Görges R, et al. Is there an ectopic secretion of monomeric calcitonin in the human being? *Langenbecks Arch Surg* 1998; 383(6):456-9.
87. Goltzman D, Tischler AS. Characterization of the immunochemical forms of calcitonin released by a medullary thyroid carcinoma in tissue culture. *J Clin Invest* 1978; 61(2):449-58.
88. Austin LA, Heath H 3rd. Calcitonin: physiology and pathophysiology. *N Engl J Med* 1981; 304(5):269-78.
89. Bories PN, Broutin A, Delette A, et al. Comparison of the Elecsys calcitonin assay with the Immulite 1000 assay. describing one case with heterophilic antibody interference. *Clin Chem Lab Med*. 2016; 54(2):e45-7.
90. Leboeuf R, Langlois MF, Martin M, et al. „Hook effect” in calcitonin immunoradiometric assay in patients with metastatic medullary thyroid carcinoma: case report and review of the literature. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91(2):361-4.
91. Tommasi M, Raspanti S. Hook effect in calcitonin immunoradiometric assay. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45(8):1073-4.
92. Uhrova J, Brodska H, Vanickova Z, et al. Procalcitonin interference in an immunometric calcitonin assay. *Scand J Clin Lab Invest* 2011; 71(2):157-62.
93. Giovanella L, Suriano S. Spurious hypercalcitoninemia and heterophilic antibodies in patients with thyroid nodules. *Head Neck* 2011; 33(1):95-7.
94. Papapetrou PD, Polymeris A, Karga H, et al. Heterophilic antibodies causing falsely high serum calcitonin values. *J Endocrinol Invest* 2006; 29(10):919-23.
95. Alves TG, Kasamatsu TS, Yang JH, et al. Macrocalcitonin is a noval pitfall in the routine of serum calcitonin immunoassay. *J Clin Endocrinol Metab* 2016; 101(2):653-8.
96. Gilson G, Schmit P, Thix J, et al. Prolactin results for samples containing macroprolactin are method and sample dependent. *Clin Chem* 2001; 47(2):331-3.



97. Hattori N, Ishihara T, Saiki Y. Macroprolactinaemia: prevalence and aetiologies in a large group of hospital workers. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2009; 71(5):702-8.
98. Cavaco B, Prazeres S, Santos MA, et al. Hyperprolactinemia due to big big prolactin is differently detected by commercially available immunoassays. *J Endocrinol Invest* 1999; 22(3):203-8.
99. Smith TP, Suliman AM, Fahie-Wilson MN, et al. Gross variability in the detection of prolactin in sera containing big big prolactin (macroprolactin) by commercial immunoassays. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(12):5410-5.
100. Vieira JG, Maciel RM, Hauache OM, et al. Unexpected high values of TSH: the presence of high molecular weight forms (macro TSH) must be investigated [Article in Portuguese]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2006; 50(3):445-9.
101. Halsall DJ, Fahie-Wilson MN, Hall SK, et al. Macro thyrotropin-IgG complex causes factitious increases in thyroid-stimulating hormone screening tests in a neonate and mother. *Clin Chem* 2006; 52(10):1968-9; author reply 1969-70.
102. Webster R1, Fahie-Wilson M, Barker P, et al. Immunoglobulin interference in serum follicle-stimulating hormone assays: autoimmune and heterophilic antibody interference. *Ann Clin Biochem* 2010; 47(Pt 4):386-9.
103. Roche Diagnostics. Elecsys Calcitonin. ms\_06445853190V5.0 2018; 1-4.
104. Toledo SP, Lourenço DM Jr, Santos MA, et al. Hypercalcitoninemia is not pathognomonic of medullary thyroid carcinoma. *Clinics (Sao Paulo)* 2009; 64(7):699-706.
105. Eckelt F, Vogel M, Geserick M, et al. Calcitonin measurement in pediatrics: reference ranges are gender-dependent, validation in medullary thyroid cancer and effects of thyroid diseases. *Clin Chem Lab Med* 2019; [Epub ahead of print].
106. Zayed AA, Alzubaidi M, Atallah S, et al. Should food intake and circadian rhythm be considered when measuring serum calcitonin level? *Endocr Pract* 2013; 19(4):620-6.
107. Polymeris A, Papapetrou PD, Papandroulaki F, et al. Hyperinsulinemia during oral glucose tolerance test and high normal serum cortisol are associated with increased secretion of calcitonin in normal subjects. *Hormones (Athens)* 2011; 10(4):304-12.
108. Kanis JA, Adams ND, Cecchetti M, et al. Ethanol induced secretion of calcitonin in chronic renal disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1979; 10(2):155-61.

109. Stevenson JC, Myers CH, Ajdukiewicz AB. Racial differences in calcitonin and katalcalcin. *Calcif Tissue Int* 1984; 36(6):725-8.
110. Skába R, Dvoráková S, Václavíková E, et al. The risk of medullary thyroid carcinoma in patients with Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int* 2006; 22(12):991-5.
111. Schwartz KE, Wolfsen AR, Forster B, et al. Calcitonin in nonthyroidal cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 1979; 49(3):438-44.
112. Becker KL, Nylén ES, White JC, et al. Clinical review 167: procalcitonin and the calcitonin gene family of peptides in inflammation, infection, and sepsis: a journey from calcitonin back to its precursors. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(4):1512-25.
113. Niccoli P, Brunet P, Roubicek C, et al. Abnormal calcitonin basal levels and pentagastrin response in patients with chronic renal failure on maintenance hemodialysis. *Eur J Endocrinol* 1995; 132(1):75-81.
114. Barbot N, Guyetant S, Beldent V, et al. Chronic autoimmune thyroiditis and C-cell hyperplasia. study of calcitonin secretion in 24 patients. *Ann Endocrinol (Paris)* 1991; 52(2):109-12.
115. Uwaifo GI, Remaley AT, Stene M, et al. A case of spurious hypercalcitoninemia: a cautionary tale on the use of plasma calcitonin assays in the screening of patients with thyroid nodules for neoplasia. *J Endocrinol Invest*. 2001; 24(5):361-9.
116. Diklić A, Paunović I, Batev N, et al. Occurrence of thyroid gland carcinoma in Graves-Basedow disease. *Acta Chir Jugosl* 1991; 38(1):61-8.
117. Ardito G, Mantovani M, Vincenzoni C, et al. Hyperthyroidism and carcinoma of the thyroid gland. *Ann Ital Chir* 1997; 68(1):23-7; discussion 27-8.
118. Guesgen C, Willms A, Zwad A, et al. Investigation of factors potentially influencing calcitonin levels in the screening and follow-up for medullary thyroid carcinoma: a cautionary note. *BMC Clin Pathol* 2013; 13(1):27.
119. Wells SA Jr, Haagensen DE Jr, Linehan WM, et al. The detection of elevated plasma levels of carcinoembryonic antigen in patients with suspected or established medullary thyroid carcinoma. *Cancer* 1978; 42(3 Suppl):1498-503.

120. Laure Giraudet A, Al Ghulzan A, Aupérin A, et al. Progression of medullary thyroid carcinoma: assessment with calcitonin and carcinoembryonic antigen doubling times. *Eur J Endocrinol* 2008; 158(2):239-46.
121. Barbet J, Campion L, Kraeber-Bodéré F, et al. Prognostic impact of serum calcitonin and carcinoembryonic antigen doubling-times in patients with medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(11):6077-84.
122. Steinbach G, Rau B, Debard AL, et al. Multicenter evaluation of a new immunoassay for procalcitonin measurement on the Kryptor System. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42(4):440-9.
123. Walter MA, Meier C, Radimerski T, et al. Procalcitonin levels predict clinical course and progression-free survival in patients with medullary thyroid cancer. *Cancer* 2010; 116(1):31-40.
124. Woliński K, Kaznowski J, Klimowicz A, et al. Diagnostic value of selected biochemical markers in the detection of recurrence of medullary thyroid cancer - comparison of calcitonin, procalcitonin, chromogranin A, and carcinoembryonic antigen. *Endokrynol Pol* 2017; 68(4):434-437.
125. Franke WG, Pinkert J, Runge R, et al. Chromogranin A: an additional tumor marker for postoperative recurrence and metastases of medullary thyroid carcinomas? *Anticancer Res* 2000; 20(6D):5257-60.
126. Frank-Raue K, Machens A, Leidig-Bruckner G, et al. Prevalence and clinical spectrum of nonsecretory medullary thyroid carcinoma in a series of 839 patients with sporadic medullary thyroid carcinoma. *Thyroid* 2013; 23(3):294-300.
127. Vogel M, Kirsten T, Kratzsch J, et al. A combined approach to generate laboratory reference intervals using unbalanced longitudinal data. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2017; 30(7):767-773.

## 7. Addendum

### 7.1 Darstellung des eigenen Beitrages

Herr Felix Eckelt ist Erstautor der Originalpublikation, die im peer-reviewed Fachjournal „Clinical Chemistry of Laboratory Medicine“ erschien und ist für die Datenaufarbeitung, Datenanalyse und Dateninterpretation verantwortlich. Er war maßgeblich an der Zusammenstellung der Ergebnisse und des Manuskriptes beteiligt.

#### **Calcitonin measurement in pediatrics: reference ranges are gender-dependent, validation in medullary thyroid cancer and thyroid diseases**

Eckelt Felix, Vogel Mandy, Geserick Mandy, Kirsten Toralf, Bae Yoon Ju, Baber Ronny, Schaab Michael, Thiery Joachim, Pfaeffle Roland, Raue Friedhelm, Kiess Wieland, Kratzsch Juergen

Erschienen in: Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2019 Feb 22, [Epub ahead of print].

Ich bin mit der Einreichung der Publikationspromotion laut Promotionsordnung der Universität Leipzig, Medizinische Fakultät einverstanden. Hiermit bestätige ich den gekennzeichneten Eigenanteil des Promovierenden.

Name	Datum	Unterschrift
korrespondierender Autor: Prof. Dr. Jürgen Kratzsch	06.06.2019	Kratzsch
Ko-Autorin: Dr. Mandy Vogel	11.06.2019	Vogel
Ko-Autorin: Mandy Geserick	11.06.2019	Geserick
Ko-Autor: Dr. Toralf Kirsten	12.06.2019	Kirsten
Ko-Autorin: Dr. Yoon Ju Bae	07.06.2019	Bae
Ko-Autor: Dr. Ronny Baber	06.06.2019	Baber
Ko-Autor: Dr. Michael Schaab	12.06.2019	Schaab
Ko-Autor: Prof. Dr. Joachim Thiery	06.06.2019	Thiery
Ko-Autor: Prof. Dr. Roland Pfäffle	07.06.2019	Pfäffle
Ko-Autor: Prof. Dr. Friedhelm Raue	13.06.2019	Raue
Ko-Autor: Prof. Dr. Wieland Kieß	07.06.2019	Kieß

## 7.2 Selbstständigkeitserklärung

### Erklärung über die eigenständige Anfertigung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Des Weiteren versichere ich, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

08.07.2019

Felix Eckelt

---

Datum

---

Felix Eckelt

### **7.3 Curriculum vitae**

Für die Veröffentlichung auf dem Publikationsserver der Universität Leipzig ist der Lebenslauf ausgenommen. Der Autor folgt damit der Empfehlung der Universitätsbibliothek Leipzig.

## 7.4 Publikationen

### Originalmanuskript

Eckelt F, Vogel M, Geserick M, et al. Calcitonin measurement in pediatrics: reference ranges are gender-dependent, validation in medullary thyroid cancer and effects of thyroid diseases. Clin Chem Lab Med 2019 Feb 22; [Epub ahead of print].

### Vortrag

Eckelt F. Determination of calcitonin reference ranges from healthy infants, children and adolescents – an important tool for the early diagnosis of medullary thyroid cancer. 10<sup>th</sup> International Meeting of Pediatric Endocrinology. Horm Res Paediatr 2017; 88 Suppl 1:1-628, FC72.

### Posterpräsentationen

Eckelt F, Geserick M, Schaab M, Thiery J, Pulzer F, Kiess W, Hiemisch A, Kratzsch J. Reference intervals for calcitonin in infants, children and adolescents – A tool for the early diagnostic of medullary thyroid carcinoma in MEN 2. Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kinderendokrinologie und -diabetologie e. V. (DGKED) und der Arbeitsgemeinschaft Pädiatrische Diabetologie e. V. (AGPD) (JA-PED). Monatsschr Kinderheilkd 2014; 162:936–962, PE-10.

Eckelt F, Geserick M, Schaab M, Thiery J, Kiess W, Hiemisch A, Kratzsch J. Determination of non-generic calcitonin reference intervals in pediatric population for diagnosis and treatment monitoring of medullary thyroid carcinoma in MEN 2. 12. Jahrestagung der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL). Clin Chem Lab Med 2015; 53:eA93–eA175, P018.

Geserick M, Eckelt F, Vogel M, Schaab M, Willenberg A, Dammer H, Thiery J, Hiemisch A, Körner A, Kiess W, Kratzsch J. Reference data for vitamin D binding protein concentrations of children and adolescents are age-dependent. 12. Jahrestagung der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL). Clin Chem Lab Med 2015; 53:eA93–eA175, P021.



## **7.5 Danksagungen**

Für die Veröffentlichung auf dem Publikationsserver der Universität Leipzig sind die Danksagungen ausgenommen. Der Autor folgt damit der Empfehlung der Universitätsbibliothek Leipzig.